

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 582**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2015 PCT/US2015/015767**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015 E 15709383 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3104878**

54 Título: **Inmunoterapia del cáncer a través de combinación de inmunoestimulación local y sistémica**

30 Prioridad:

14.02.2014 US 201461940109 P
29.04.2014 US 201461985787 P
08.07.2014 US 201462022070 P
30.10.2014 US 201462072548 P
08.01.2015 US 201562101335 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2020

73 Titular/es:

IMMUNE DESIGN CORP. (100.0%)
1616 Eastlake Ave. E., Suite 310
Seattle, WA 98102, US

72 Inventor/es:

TER MEULEN, JAN, HENRIK y
PAYA CUENCA, CARLOS, V.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 582 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

Inmunoterapia del cáncer a través de combinación de inmunoestimulación local y sistémica

Antecedentes

Campo técnico

- 5 La presente divulgación se refiere en general a métodos para potenciar la inmunoterapia del cáncer a través de combinación de inmunoestimulación local y sistémica.

Descripción de la técnica relacionada

10 El sistema inmunitario de un hospedador proporciona el medio para montar rápida y específicamente una respuesta protectora contra microorganismos patógenos y también para contribuir al rechazo de tumores malignos. En general se ha descrito que las respuestas inmunitarias incluyen respuestas humorales, en que se producen anticuerpos específicos para antígenos mediante linfocitos B diferenciados, y respuestas mediadas por células, en que diversos tipos de linfocitos T eliminan antígenos mediante una diversidad de mecanismos. Por ejemplo, los linfocitos T auxiliares CD4 (también llamados CD4+) que pueden reconocer antígenos específicos pueden responder liberando mediadores solubles tales como citocinas para reclutar células adicionales del sistema inmunitario para que participen en una respuesta inmunitaria. Los linfocitos T citotóxicos CD8 (también llamados CD8+) también pueden reconocer antígenos específicos y pueden unirse a destruir o dañar una célula o partícula que alberga antígeno. En particular, las respuestas inmunitarias mediadas por células que incluyen una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) pueden ser importantes para la eliminación de células tumorales y células infectadas con virus.

20 El cáncer incluye una amplia gama de enfermedades y afecta a aproximadamente uno de cada cuatro individuos en todo el mundo. Una respuesta CTL es una característica clave de vacunas eficaces contra el cáncer; los linfocitos T CD4 eficaces auxiliares también desempeñan probablemente una función crítica en la activación de linfocitos T CD8 productivos y proporcionan beneficio clínico. La vacuna basada en células dendríticas (DC) autólogas Sipuleucel-T (PROVENCE®) se aprobó recientemente por la FDA para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico resistente a castración, aunque el beneficio de supervivencia asociado con este tratamiento es moderado de 4,1 meses, dejando una necesidad importante de mejora (véase, por ejemplo, Kantoff, *et al.* *New Engl. J. Med.* 363(5):411 (2010)). La vacuna basada en vector de poxvirus ProstVac® VF también muestra un beneficio de supervivencia significativo en fase II (véase, por ejemplo, Kantoff, *et al.*, *Clin. Oncol.* 28(7): 1099 (2010)). Las inmunoterapias activas tales como Sipuleucel-T y ProstVac® VF en general se han tolerado mejor que las pautas terapéuticas que comprenden el tratamiento de referencia actual para enfermedad resistente a castración (véase, por ejemplo, Petrylak, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 351(15):1513 (2004); Sylwester, *et al.*, *J. Exp. Med.* 202(5):673 (2005)). Estos éxitos clínicos demuestran que la respuesta inmunitaria se puede aprovechar en un entorno de cáncer para proporcionar resultados mejorados en el paciente y supervivencia prolongada.

35 Muchos antígenos exógenos (es decir, no propios) son poco inmunógenos y requieren administración de un adyuvante para proporcionar una respuesta inmunitaria satisfactoria contra un antígeno. También pueden usarse adyuvantes para desviar una respuesta inmunitaria hacia una respuesta humoral o una respuesta mediada por células, y también pueden usarse determinados adyuvantes para desviar la respuesta de anticuerpos a un isotipo de anticuerpo particular o desviar una respuesta celular hacia un subconjunto de linfocitos T particular. La elección de adyuvante y/o modo de suministro de un adyuvante para inducir o potenciar la respuesta inmunitaria contra inmunógenos pueden ser aspectos importantes del desarrollo de vacunas terapéuticas y profilácticas.

40 Después del tratamiento quirúrgico y dependiendo de su estadio, el cáncer de vejiga invasivo no muscular (NMIBC) puede controlarse por inmunoterapia usando la vacuna del Bacilo de Calmette Guerin (BCG) instilada repetidamente en la vejiga, habitualmente como un ciclo de seis semanas seguido de tratamiento de mantenimiento anual. La aplicación de la vacuna de BCG en este contexto es un tratamiento de primera línea y en general se considera la inmunoterapia más antigua y más satisfactoria hasta la fecha del cáncer (Gandh, N.M., *et al.*, *BJU Int.*, agosto; 112(3):288-97 (2013)).

50 El efecto antitumoral de BCG no está completamente comprendido, pero implica infección de células cancerosas uroteliales o de vejiga e inducción de respuestas tanto inflamatorias no específicas como antitumorales específicas (Kawai, *et al.* *Cancer Sci.*, enero; 104(1):22-7 (2013)). Subconjuntos de células del sistema inmunitario que tienen funciones potenciales en el tratamiento con BCG incluyen linfocitos CD4+ y CD8+, linfocitos citolíticos naturales, granulocitos, macrófagos y células dendríticas. Las células cancerosas de vejiga se destruyen mediante citotoxicidad directa por estas células, por secreción de factores solubles tales como TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral) y, en algún grado, por la acción directa de BCG (Redelman-Sidi G., *ET AE.*, *Nat Rev Urol.*, 4 de febrero. [Publicación electrónica previa a impresión] (2014)). Debe apreciarse que, en este contexto, por ejemplo, el uso de BCG en el tratamiento de cáncer de vejiga, BCG funciona como agonista de TLR. En particular, TLR2 y TLR4 parecen regular distintos aspectos de la respuesta inmunitaria del hospedador contra BCG (véase, *J Leukoc Biol.* 2003;74:277-86).

Una limitación importante del tratamiento actual con BCG es la ausencia de respuesta en un número sustancial de pacientes. Por ejemplo, dependiendo del criterio de valoración estudiado, hasta un 50 % de los pacientes no logran responder y muestran progresión del cáncer a enfermedad invasiva muscular. Adicionalmente, aproximadamente un tercio de los pacientes que responden inicialmente al tratamiento mostrarán recidiva del tumor (Sylvester, R.J., *Int J Urol.*, febrero; 18(2): 113-20 (2011)). Un estudio reciente mostró que pacientes con recidiva después de tratamiento con BCG pueden presentar carcinoma urotelial del sistema urinario superior o la uretra prostática, que no es accesible a BCG (Giannarini, G., *et al.*, *Eur Urol.* 9 de octubre. [Publicación electrónica previa a impresión] 2013)). Además, pacientes sin inmunidad de linfocitos T preexistente medible a BCG (debido a inmunización con BCG previa o exposición natural a micobacterias) tienen una tasa de supervivencia sin recidiva inferior (Biot, C., *et al.*, *Sci Transl Med.*, 6 de enero; 4(137):137ra72 (2012)). Finalmente, la inmunoterapia con BCG puede tener efectos secundarios graves como resultado de infección local o sistémica con BCG (Miyazaki, J., *et al.*, *Jpn J Clin Oncol.*, agosto; 43(8):827-34 (2013)).

Varias vías de investigación se están siguiendo actualmente para mejorar el tratamiento con BCG actual. Por ejemplo, el remplazo de BCG clásico con BCG manipulado genéticamente que exprese citocinas de tipo Th1 o que sea de replicación incompetente puede mejorar la eficacia o reducir los efectos secundarios (Kawai, *et al.* *Cancer Sci.*, enero; 104(1):22-7 (2013)). Otro ejemplo es el uso de agonistas de molécula pequeña de receptores de tipo toll (TLR) para estimular una respuesta inmunitaria innata en la vejiga (Falke, J., *et al.*, *J Urol.*, enero; 189(6):2077-82 (2013)). Finalmente, se están usando vectores víricos (por ejemplo, basados en adenovirus) para inducir "muerte celular inmunógena" en células cancerosas inducidas por virus y para expresar además factores inmunoestimuladores, tales como GM-CSF (Burke, J., *Cytokine Growth Factor Rev.*; 21(2- 3):99-102 (2010)). Sin embargo, ninguna de las estrategias anteriores ha progresado hasta la fecha más allá de ensayos clínicos en fase temprana y en ausencia de buenos modelos preclínicos para cáncer de vejiga su eficacia potencial es difícil de predecir.

Un estudio reciente sugiere que el cáncer de vejiga está asociado con herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV), KSHV, también conocido como herpesvirus humano 8. En particular, se detectó ADN de KSHV en un 55 % de pacientes (M. Paradzik *et al.* *Tumor Biology*, 2014, 35(1), pág. 567-572). Más en general, aproximadamente un 12 % de todos los cánceres humanos en todo el mundo están causados por infección por virus oncógeno (véase, por ejemplo, Mesri *et al.*, 2014, *Cell Host & Microbe* 15:266-282; Bouvard, V., *et al.* (2009). *Lancet Oncol.* 10, 321-322; Boyle, P., y Levin, B. (2008). *World Cancer Report 2008.* (Lyon: International Agency for Research on Cancer and World Health Organization Press); de Martel, C., *et al.*, (2012). *Lancet Oncol.* 13, 607-615).

La publicación internacional WO 2013/172927 divulga una estrategia de vacunación que establece inmunidad protectora, incluyendo una población de linfocitos T de memoria protectores. La estrategia de vacunación incluye las etapas de administración parenteral al sujeto de al menos un inmunógeno, en la que el al menos un inmunógeno induce una respuesta inmunitaria, y administración local a la ubicación anatómica del sujeto de al menos una quimiocina, en la que la quimiocina recluta la respuesta inmunitaria a la ubicación anatómica. En particular, la quimiocina puede seleccionarse del grupo que consiste en CXCL9, CXCL10 y CCL5.

La presente invención proporciona un tratamiento inmunoterapéutico de cánceres, incluyendo cánceres inducidos por virus. Estas y otras ventajas se proporcionan en la presente divulgación.

Breve compendio

La presente invención, que se expone en las reivindicaciones adjuntas, proporciona una composición que comprende:

a) una primera composición que comprende una partícula de vector opcionalmente con un adyuvante, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión recombinante en la que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a cáncer, y en la que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, y

b) una segunda composición que comprende un agonista de TLR4 en la que la composición no comprende antígeno;

en la que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado,

para su uso en un método de aumento de linfocitos T en un microentorno tumoral en un sujeto,

donde la primera composición se administra de forma sistémica, induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado a cáncer en el sujeto; y donde la segunda composición se administra por vía intratumoral o peritumoral al sujeto; y donde la primera y segunda composición se administran simultánea o secuencialmente; aumentando de ese modo los linfocitos T en el microentorno tumoral, en la que, cuando está presente, el adyuvante es glucopiranosil lípido A (GLA).

Se exponen aspectos adicionales de la presente invención en las reivindicaciones.

Además, la presente divulgación también proporciona lo siguiente:

5 La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para potenciar la inmunoterapia del cáncer, tal como
 10 cáncer inducido por virus, mediante combinación de inmunestimulación local y sistémica. En una realización de la
 presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento del cáncer, que comprende a) inducir una respuesta
 inmunitaria específica para un inmunógeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una primera
 composición que comprende una partícula de vector, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión
 15 recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica el
 inmunógeno, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión
 reguladora; y b) administrar de forma local al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante
 farmacéuticamente adecuado, en el que la segunda composición no comprende o está sustancialmente desprovista
 de inmunógeno, en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un
 20 excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se
 administran simultánea o secuencialmente. En determinadas realizaciones, la administración de la segunda
 composición induce la expresión de una o más citocinas que pueden reclutar linfocitos T CD8 al sitio local de
 administración.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la primera composición y la
 segunda composición se administran secuencialmente, y en el que la primera composición se administra al sujeto en
 un primer sitio y la segunda composición se administra al sujeto en un segundo sitio, en el que el primer sitio y el
 25 segundo sitio son diferentes. En otra realización más, se proporciona un método mencionado anteriormente en el
 que la primera composición se administra al primer sitio mediante una primera vía y la segunda composición se
 administra al segundo sitio mediante una segunda vía.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la
 primera vía y la segunda vía son diferentes y cada una se selecciona de parenteral, enteral, oral, intramuscular,
 30 intradérmica, subcutánea, intratumoral, intranodal, perinodal, intranasal, transdérmica, por inhalación, a la mucosa,
 intravesical y tópica. En otra realización, la primera vía es intramuscular, intradérmica o subcutánea y la segunda vía
 es intravesical, intratumoral o intranodal.

En otra realización más, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la primera composición se
 administra antes de la administración de la segunda composición. En otra realización, se proporciona un método
 mencionado anteriormente en el que la segunda composición se administra antes de la administración de la primera
 35 composición. En otra realización, la primera composición y la segunda composición se administran
 simultáneamente, pero en diferentes sitios. En otra realización más, se proporciona un método mencionado
 anteriormente en el que la primera composición y/o la segunda composición se administran 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
 veces.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el
 40 vector de expresión recombinante se selecciona de un genoma de vector retroviral, un genoma de vector lentiviral,
 genoma de vector posviral, genoma de vector de virus vaccinia, genoma de vector adenoviral, genoma de vector
 de virus adenoasociado, genoma de vector herpesviral, genoma de vector alfavirus, ADN plasmídico y ARN. En
 otra realización, la partícula de vector es una partícula de vector lentiviral que comprende el genoma de vector
 lentiviral; una partícula de vector posviral que comprende el genoma de vector posviral; una partícula de vector
 45 de virus vaccinia que comprende el genoma de vector de virus vaccinia; una partícula de vector adenoviral que
 comprende el genoma de vector adenoviral; una partícula de vector de virus adenoasociado que comprende el
 genoma de vector de virus adenoasociado; una partícula de vector herpesviral que comprende el genoma de vector
 herpesviral; o una partícula de vector de alfavirus que comprende el genoma de vector de alfavirus. En otra
 realización más, la partícula de vector es la partícula de vector lentiviral y comprende el genoma de vector
 lentiviral. En otra realización más, la partícula de vector lentiviral comprende además una envoltura que
 comprende una glucoproteína E2 de virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con
 la SEQ ID NO: 1, en la que el resto 160 está ausente o es un aminoácido diferente a ácido glutámico, y en la que la
 glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la partícula de vector suministra
 50 el vector de expresión recombinante a una célula presentadora de antígeno. En una realización, la célula
 presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

En otra realización más, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el inmunógeno es un
 antígeno vírico de un virus oncogénico. Virus oncogénicos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, EBV, HPV, HBV,
 HCV, HTLV y KSHV. Antígenos víricos ejemplares de virus oncogénicos que pueden usarse en la presente memoria
 55 incluyen, aunque sin limitación, EBV: EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; HPV: E6, E7, E5; HBV: HBx; HCV: Core, NS3,
 Ns5A; HTLV: Tax, HBZ; KSHV: vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1.

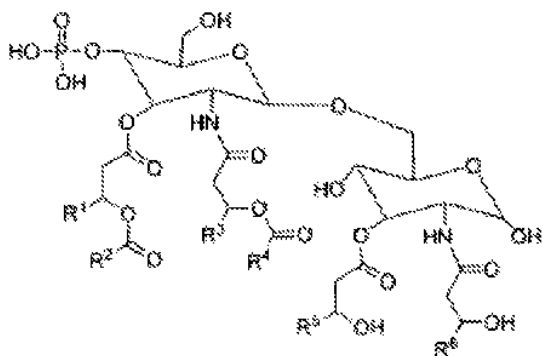
En otra realización, el inmunógeno es un antígeno asociado a tumor. En otra realización, el antígeno asociado a
 tumor se selecciona de p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, cinasas dependientes de ciclina, CTA, NY-ESO-1,
 LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE,

MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A, antígeno T de BK, MAGE-A2, MAGE-A6, MAGE-A12, MART-1, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPEmbcr-abl, BCR-ABE, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , transductor 1 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, tirosina cinasas receptoras, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), tirosina cinasas citoplásmicas, familia src, syk-ZAP70, cinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6, factores inducibles por hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α , factor nuclear Kappa B (NF- κ B), receptores Notch, Notch1-4, c-Met, dianas de mamífero de rapamicina (mTOR), WNT, cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, 5T4 de carcinoma de células renales, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de corte de traslocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión de ETS de TMPRSS2), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, poli(ácido siálico), MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLobH, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumaina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, y antígeno 1 relacionado con fos.

En otra realización, se proporciona un método en la presente memoria en el que el antígeno asociado a tumor se selecciona de un antígeno de cáncer de vejiga. En una realización, el antígeno de cáncer de vejiga se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A y antígeno T de BK.

En otra realización más de la presente divulgación, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la respuesta inmunitaria inducida comprende una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos. En determinadas realizaciones, se proporciona un método como se describe en la presente memoria en el que la respuesta inmunitaria inducida comprende linfocitos T CD4 y/o CD8 específicos de antígeno, linfocitos T de memoria efectoras (T_{EM}), linfocitos T de memoria centrales (T_{CM}) y/o linfocitos T de memoria residentes en tejido (T_{RM}). En determinadas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, se recluta una o más de estas poblaciones de células a un sitio local de interés (por ejemplo, la mucosa, intratumoral, intranodal). En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la respuesta inmunitaria inducida comprende la producción de un anticuerpo específico de inmunógeno.

En otra realización más, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A no tóxico. En una realización, el adyuvante relacionado con lípido A no tóxico es glucopiranosil lípido A (GLA). En otra realización, el GLA se formula en una emulsión de aceite en agua estable. En otra realización más, el GLA tiene la fórmula:



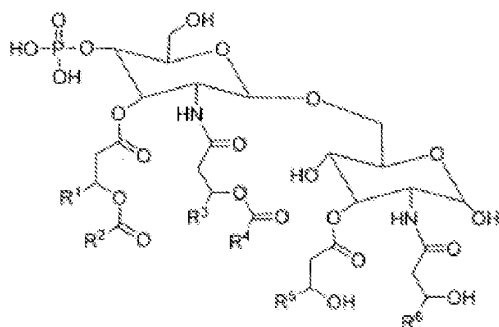
donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶, son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀. En otra realización más, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.

En determinadas realizaciones de los métodos de la presente memoria, el método comprende además administrar una composición que comprende BCG. En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método en el que la composición adyuvante comprende además BCG.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la primera composición comprende además un adyuvante.

En otra realización más, se proporciona un método de tratamiento de un cáncer inducido por virus que comprende a) inducir una respuesta inmunitaria específica para un inmunógeno asociado con un cáncer inducido por virus (por ejemplo, un antígeno vírico derivado del virus asociado con el cáncer) en un sujeto, que comprende administrar al

5 sujeto una primera composición que comprende una partícula de vector lentivírico, comprendiendo la partícula de vector lentivírico un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica el inmunógeno, en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, en el que la partícula de vector lentivírico comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 de virus Sindbis que tiene a menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que el resto 160 está ausente o es un aminoácido diferente de ácido glutámico, y en la que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis; y b) inducir la expresión de una o más citocinas que pueden reclutar linfocitos T CD8 al tumor, que comprende administrar al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente aceptable, en el que el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A no tóxico, que es glucopiranosil lípido A (GLA) formulado en una emulsión de aceite en agua estable, en el que el GLA tiene la fórmula:



15 donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo y R² y R⁴ igual a tridecilo; en el que las citocinas se seleccionan del grupo que consiste en Cxcl9, Cxcl10, CCL2, CCL3, MCP-1, TNF α , IFN γ , IP-10; en el que el inmunógeno asociado con un cáncer inducido por virus es un antígeno vírico seleccionado de EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; E6, E7, E5; HBx; HCV Core, NS3, Ns5A; Tax, HBZ; vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1; en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente, en el que la primera composición se administra por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea y la segunda composición se administra por vía intratumoral o intravesical; y en el que la segunda composición comprende opcionalmente BCG.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un kit que comprende una primera composición y una segunda composición de acuerdo con uno cualquiera de los métodos previos, anteriores o descritos en la presente memoria.

25 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un cáncer inducido por virus oncógeno, que comprende: a) inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno de virus oncógeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una primera composición que comprende una partícula de vector, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica el antígeno de virus oncógeno, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora; y b) administrar al sujeto en un sitio local una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado, en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente. En una realización, la administración de la segunda composición en el sitio local induce la expresión de una o más citocinas que pueden reclutar linfocitos T al sitio local de administración. En determinadas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos T específicos de antígeno, tales como linfocitos T CD4 y/o CD8 específicos de antígeno, linfocitos T de memoria efectoras (T_{EM}), linfocitos T de memoria centrales (T_{CM}) y/o linfocitos T de memoria residentes en tejido (T_{RM}). En una realización del método, el sitio local de administración local es intratumoral, intranodal, intravesical o a la mucosa. En otra realización, el vector de expresión comprende además un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a tumor. En una realización adicional, la segunda composición comprende además el antígeno asociado a tumor.

Un aspecto específico de la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer inducido por virus oncógeno en un sujeto, que comprende: a) inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno derivado del virus oncógeno en el sujeto, que comprende administrar al sujeto una primera composición que comprende una partícula de vector, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica el antígeno derivado del virus oncógeno, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora; y b) administrar al sujeto por vía intratumoral una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado, en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición

se administran simultánea o secuencialmente. En una realización, la administración de la segunda composición por vía intratumoral induce la expresión de una o más citocinas o quimiocinas que pueden reclutar linfocitos T, en particular linfocitos T específicos de antígeno (por ejemplos, linfocito T CD4 y/o CD8, linfocitos T de memoria efectoros (T_{EM}), linfocitos T de memoria centrales (T_{CM}) y/o linfocitos T de memoria residentes en tejido (T_{RM}) al tumor.

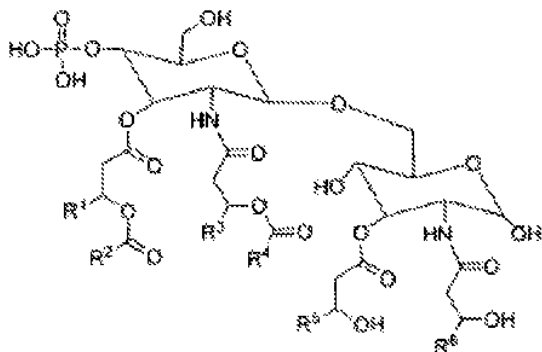
Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de tratamiento de un cáncer, que comprende: a) inducir una respuesta inmunitaria específica para un antígeno asociado a cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una primera composición que comprende una partícula de vector, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica el antígeno asociado a cáncer, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora; y b) administrar por vía intratumoral al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado; en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente,

En determinadas realizaciones de los métodos de tratamiento del cáncer, incluyendo cánceres inducidos por oncovirus, la primera composición y/o la segunda composición se administran 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. En otras realizaciones, el vector de expresión recombinante se selecciona de un genoma de vector retroviral, un genoma de vector lentiviral, un genoma de vector poxviral, un genoma de vector de virus vaccinia, un genoma de vector adenoviral, un genoma de vector de virus adenoasociado, un genoma de vector herpesviral, un genoma de vector de alfavirus, ADN plasmídico y ARN. En una realización adicional más de los métodos de la presente memoria, la partícula de vector es una partícula de vector retroviral que comprende el genoma de vector retroviral; una partícula de vector lentiviral que comprende el genoma de vector lentiviral; una partícula de vector poxviral que comprende el genoma de vector poxviral; una partícula de vector de virus vaccinia que comprende el genoma de vector de virus vaccinia; una partícula de vector adenoasociado que comprende el genoma de vector de virus adenoasociado; una partícula de vector herpesviral que comprende el genoma de vector herpesviral; o una partícula de vector de alfavirus que comprende el genoma de vector de alfavirus. En una realización, la partícula de vector es la partícula de vector lentiviral y comprende el genoma de vector lentiviral. En una realización particular, la partícula de vector lentiviral comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, y en la que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis. En otra realización de los métodos de la presente memoria, la partícula de vector suministra el vector de expresión recombinante a una célula dendrítica. En determinadas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el inmunógeno es un antígeno asociado a tumor y puede seleccionarse de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A, y antígeno T de BK, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, cinasas dependientes de ciclina, MAGE-A2, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, Gnt-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPEmbcr-abl, BCR-ABE, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , transductor 1 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, tirosina cinasas receptoras, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), tirosina cinasas citoplásmicas, familia src, syk-ZAP70, cinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6, factores inducibles por hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α , factor nuclear Kappa B (NF- κ B), receptores Notch, Notch1-4, c-Met, dianas de mamífero de rapamicina (mTOR), WNT, cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, 5T4 de carcinoma de células renales, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de corte de traslocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión de ETS de TMPRSS2), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, poli(ácido siálico), MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoBoH, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumaina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, y antígeno 1 relacionado con fos.

En otra realización de los métodos descritos en la presente memoria, el antígeno de cáncer de vejiga se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A y antígeno T de BK.

En una realización de los métodos descritos en la presente memoria para tratar el cáncer, la respuesta inmunitaria inducida comprende una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos o la producción de un anticuerpo específico de inmunógeno.

En determinadas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria para tratar el cáncer, el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A no tóxico. En particular, el adyuvante relacionado con lípido A no tóxico es glucopiranosil lípido A (GLA). En determinadas realizaciones, el GLA se formula en una emulsión de aceite en agua estable. En una realización el GLA tiene la fórmula:



5 donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶, son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀. En otra realización, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método de aumento de linfocitos T en el microentorno tumoral, que comprende a) administrar a un sujeto que tiene un tumor una primera composición que comprende una partícula de vector, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a cáncer, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado a cáncer en el sujeto; y b) administrar por vía intratumoral o peritumoral al sujeto una segunda composición que comprende un agonista de TLR4 en el que la composición no comprende antígeno; en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente; aumentando de ese modo los linfocitos T en el microentorno tumoral. En determinadas realizaciones, la partícula de vector es una partícula de vector lentivírico que comprende el genoma de vector lentivírico; una partícula de vector poxvírico que comprende el genoma de vector poxvírico; una partícula de vector de virus vaccinia que comprende el genoma de vector de virus vaccinia; una partícula de vector adenovírico que comprende el genoma de vector adenovírico; una partícula de vector de virus adenoasociado que comprende el genoma de vector de virus adenoasociado; una partícula de vector herpesvírico que comprende el genoma de vector herpesvírico; o una partícula de vector de alfavirus que comprende el genoma de vector de alfavirus. En otra realización, la partícula de vector es una partícula de vector lentivírico y comprende el genoma de vector lentivírico. En realizaciones adicionales, la partícula de vector lentivírico comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, y en la que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 de virus Sindbis y, en algunas realizaciones, suministra el vector de expresión recombinante a una célula dendrítica. En algunas realizaciones del método, el agonista de TLR4 es un adyuvante relacionado con lípido A no tóxico tal como GLA descrito en la presente memoria y puede formularse en emulsión de aceite en agua estable.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estrategia de vacunación de sensibilización-atracción. Se inocularon ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) con células B16F10-OVA en el día 0. Diez días después de la inoculación del tumor, se inmunizaron los ratones que albergaban tumor con VP02/OVA o VP02/GFP (vector de control) en la base de la cola. Veintiún días después de la inoculación del tumor, a los ratones inmunizados se les dio una administración intratumoral de GLA/SE. Los tumores se recogieron inmediatamente antes de (D+0), un día después (D+1) o dos días después (D+2) de la administración de GLA/SE. Las células recogidas se tiñeron para análisis de citometría de flujo. **Figura 1 (A)** Diagramas de puntos representativos de los puntos temporales analizados. La selección roja incluye células CD3ε + CD8α+ específicas de OVA. **Figura 1 (B)** Porcentaje promedio de células CD3ε + CD8α+ específicas de OVA de los puntos temporales analizados.

Figura 2: Reclutamiento de linfocitos al tumor por la estrategia de vacunación de sensibilización-atracción. Se inocularon ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) con 1x10⁵ células B16F10-OVA, s.c., en el lomo, en el día 0. Siete días después de la inoculación del tumor, los ratones que albergaban tumor se inmunizaron con VP02/OVA o VP02/GFP (vector de control) en la base de la cola. Empezando el día 7 (D7) o el día 14 (D14) después de la exposición al tumor, a los ratones inmunizados se les dio una administración intratumoral de 5 µg de GLA/SE al 2 % cada 3-4 días. En el día 18, se recogieron los tumores. Los linfocitos de infiltración tumoral se aislaron en un lecho 1:1 de Histopaque®-1083 y se tiñeron con MHC-I/pentámeros SIINFEKL, anticuerpos de CD3, CD8, CD4, CD25 y

FOXP3 para el análisis de citometría de flujo. **Figura 2 (A)** Se muestran diagramas de puntos representativos para la estrategia de selección, con los promedios de % de grupo indicados. **Figura 2 (B)** Se muestran diagramas de dispersión para el % de células positivas a pentámero y el % de linfocitos T reguladores para cada grupo. Las barras de error representan la media \pm ETM.

5 **Figura 3:** Eficacia terapéutica de la estrategia de vacunación de sensibilización-atracción. **Figura 3 (A)** Se inocularon ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) con 1×10^5 células B16F10-OVA, s.c., en el lomo, en el día 0. Siete días después de la inoculación del tumor, los ratones que albergaban tumor se inmunizaron con VP02/OVA o VP02/GFP (vector de control) en la base de la cola. Empezando el día 7 (D7) o el día 14 (D14) después de la exposición al tumor, a los ratones inmunizados se les dio una administración intratumoral de 5 μ g de GLA/SE al 2 % cada 3-4 días. **Figura 3 (B)** Se inocularon ratones BALB/c (5 ratones por grupo) con 1×10^5 células CT26, s.c., en el lomo, en el día 0. Siete días después de la inoculación del tumor, los ratones que albergaban tumor se inmunizaron con VP02/AH1A5 o VP02/GFP (vector de control) en la base de la cola. Empezando el día 7 (D7) o día 14 (D14) después de la exposición al tumor, a los ratones inmunizados se les dio una administración intratumoral de 5 μ g de GLA/SE al 2 % cada 3-4 días. Se midió el crecimiento del tumor 2-3 veces por semana. Se calculó el volumen del tumor basándose en una fórmula elipsoide modificada: longitud x anchura² x $\pi/6$. Las barras de error representan la media \pm ETM.

Descripción detallada

La presente invención proporciona, entre otras cosas, una inmunoterapia integrada para cánceres, tales como cánceres inducidos víricamente, que comprende una composición para su uso como se expone en las reivindicaciones.

La presente invención podría usarse en el entorno de cualquier cáncer, incluyendo cáncer inducido víricamente, tal como carcinoma de células de Merkel (virus de polioma de Merkel; antígeno T grande), cánceres de cabeza y cuello (HPV; antígenos E6 y E7), cáncer cervicouterino (HPV; antígenos E6 y E7), cáncer hepático (antígenos grande, medio y pequeño S, de hepatitis B; virus de hepatitis C), cáncer nasofaríngeo (EBV; antígeno 1 nuclear de EB (EBNA1), proteína de membrana latente 1 y 2 (LMP-1), (LMP-2), sarcoma de Kaposi (HHV8) y glioblastoma (citomegalovirus humano pp65, IE1, us28).

Sin limitarse a teoría alguna, el uso de vectores de expresión, incluyendo vectores víricos, que expresan uno o varios antígenos víricos o uno o varios antiguos tumorales en combinación con aplicación intratumoral de un antagonista de TLR4, tal como un GLA descrito en la presente memoria, en una aplicación novedosa (sensibilización-atracción), provoca la producción local en o alrededor del tumor de las citocinas, incluyendo cxcl9 y cxcl10, que dirigirá linfocitos T citotóxicos específicos de tumor inducidos de forma sistémica o local al sitio del cáncer. De nuevo, sin limitarse a teoría alguna, mediante este mecanismo y el efecto inunoestimulador de un agonista de TLR4 tal como GLA (por ejemplo, presentación potenciada de antígeno por células dendríticas, así como su maduración, mediante estimulación del receptor de TLR4) la eficacia de inmunoterapia de cánceres, incluyendo cánceres inducidos por virus, se potenciará enormemente.

El primer informe de una sensibilización-atracción usando una sensibilización de vector lentivírico sistémico para inducir linfocitos T CD8, seguido de inyección intratumoral de ligandos del receptor de tipo toll para potenciar la eficacia terapéutica se publicó en 2013 por Xiao *et al.* (J. Immunotherapy, 1 de junio de 2013; 190(11):5866-5873). En estos experimentos, se usó un vector lentivírico seudotipado de VSV para la inmunización, y los agonistas del receptor de tipo toll 3 (poli-I:C) y 9 (CpG) se inyectaron por vía intratumoral (i.t.). aunque los investigadores observaron un efecto terapéutico, a diferencia de la presente divulgación, la inyección i.t. de ligandos de TLR3/9 disminuyó los números absolutos de TIL CD8 y CD4 en comparación con la inmunización con vector lentivírico en solitario (véase, Xiao *et al.*, figura 2A), lo que indica que la potenciación del efecto antitumoral mediante la inyección de ligandos de TLR3/9 no se debía a un aumento en los números de TIL CD8 y CD4. Por lo tanto, no habría dado lugar a que los expertos en la materia usaran administración i.t. o local de agonistas de TLR para el reclutamiento de linfocitos T al sitio del tumor en vista de este estudio.

En un aspecto, para abordar la necesidad insatisfecha de los tratamientos existentes para cánceres inducidos por virus (incluyendo aunque sin limitación, cáncer de vejiga, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, linfoma de Burkitt, linfoma no hodgkiniano, trastorno linfoproliferativo después de trasplante, cáncer nasofaríngeo, carcinoma cervicouterino, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, leucemia/linfoma de linfocitos T en el adulto), la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para inducir y/o potenciar una respuesta de linfocitos T CD8 antivírica que está redirigida al tumor. Para este fin, la inmunización con, por ejemplo, un vector de expresión recombinante, por ejemplo, un vector lentivírico dirigido a células dendríticas como se describe en la presente memoria, que expresa un antígeno vírico específico o, en algunas realizaciones, uno o más antígenos tumorales asociados a cáncer o ambos (es decir, "inmunógeno"), seguido de administración local (por ejemplo, intratumoral, intranodal, a la mucosa o tratamiento intravesical) con un agonista de TLR tal como un agonista de TLR4 glucopiranosil lípido A (GLA) como se describe en la presente memoria. Esto provoca la inducción de linfocitos T CD8 específicos de antígeno vírico y su redirección o reclutamiento o migración dirigida al tumor, provocando un efecto terapéutico superior a las inmunoterapias actuales. A ese respecto, y sin limitarse a teoría alguna, los antígenos víricos asociados a tumor tales los descritos en la presente memoria (por ejemplo,

HPV-E6/E7) son antígenos exógenos y, por tanto, son más inmunógenos que los antígenos asociados a tumor endógenos, que aumentarían la eficacia de la inmunoterapia.

5 En determinadas realizaciones (por ejemplo, para cáncer de vejiga), la administración local puede incluir opcionalmente BCG como se describe en la presente memoria, y en determinadas realizaciones, la respuesta de linfocitos T CD8 específicos de antígeno se redirige a la mucosa de la vejiga.

10 La presente divulgación, por lo tanto, proporciona en una realización una inmunización "sensibilización-atracción" en la que una primera composición de "sensibilización" o en determinadas realizaciones de "sensibilización/refuerzo" comprende, por ejemplo, un vector de expresión recombinante que expresa un inmunógeno específico (por ejemplo, uno o más antígenos asociados a tumor; uno o más antígenos víricos donde el virus es un virus oncógeno asociado con cáncer), para inducir una respuesta de linfocitos T CD8 va seguida por una composición "de atracción" que comprende un agonista de TLR4 tal como GLA para reclutar los linfocitos T CD8 al tumor. Como se indica anteriormente, los antígenos víricos asociados a tumor son más inmunógenos que los antígenos asociados a tumor endógenos, que aumentarán la eficacia de la inmunoterapia. Sin embargo, en determinadas realizaciones, el inmunógeno puede ser un antígeno asociado a cáncer no asociado con un virus oncógeno. De acuerdo con diversas realizaciones de la divulgación, el vector de expresión y el agonista de TLR4 puede administrarse múltiples veces, en diversos sitios y usando diversas vías, como se describe en la presente memoria. La inmunización de sensibilización-atracción también se ha descrito en la publicación internacional n.º WO 2013/172927.

20 La presente divulgación, en una realización, proporciona en una realización una primera composición de "sensibilización" o de "sensibilización/refuerzo" que comprende, por ejemplo, un vector de expresión recombinante que expresa uno o más antígenos tumorales asociados a cáncer de vejiga específicos o uno o más inmunógenos para inducir una respuesta inmunitaria, incluyendo una respuesta de linfocitos T CD8 y una composición de "atracción" que comprende un agonista de TLR4 tal como GLA con o sin BCG para reclutar los linfocitos T específicos de antígeno, incluyendo linfocito T CD8 a la mucosa de la vejiga. De acuerdo con diversas realizaciones de la divulgación, el vector de expresión y el agonista de TLR (con o sin BCG) puede administrarse múltiples veces, en diversos sitios y usando diversas vías, como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una inmunoterapia de primera línea integrada para cáncer establecido de vejiga.

30 En una realización, la presente divulgación proporciona un método que comprende administrar (i) una vacuna basada en vector lentivírico dirigida a células dendríticas que expresa uno o más antígenos o inmunógenos de virus oncógeno (por ejemplo, uno o más antígenos de un virus asociado con la inducción de un cáncer) aplicados por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular como inmunización de sensibilización, (ii) la misma vacuna aplicada por vía intratumoral como inmunización de refuerzo, (iii) el GLA sintético aplicado repetidamente por vía intratumoral en solitario o, en algunas realizaciones, junto con el antígeno de virus oncógeno o un antígeno asociado a tumor, como tratamiento de mantenimiento y para dirigir linfocitos T citotóxicos sensibilizados de forma sistémica o local al tumor.

35 En una realización, la presente divulgación proporciona un método que comprende administrar (i) una vacuna basada en vector lentivírico dirigido a células dendríticas que expresa uno o más antígenos de virus oncógeno y uno o más antígenos o inmunógenos asociados a tumor aplicada por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular como inmunización de sensibilización, (ii) la misma vacuna aplicada por vía intravesical como inmunización de refuerzo, (iii) el GLA sintético aplicado repetidamente a la mucosa, por vía intratumoral o intravesical, en solitario u opcionalmente en combinación con BCG, como tratamiento de mantenimiento y para dirigir linfocitos T citotóxicos sensibilizados de forma sistémica o local a la mucosa de la vejiga. Dicho método se usa para el tratamiento de cánceres inducidos por virus. En determinadas realizaciones, los métodos de la presente memoria se usan para el tratamiento de cáncer de vejiga.

45 El uso de administración local de GLA provocará la producción local de citocinas, incluyendo, aunque sin limitación Cxcl9 y Cxcl10, en el tumor que dirigirá linfocitos T citotóxicos específicos de virus inducidos de forma sistémica o local o linfocitos T citotóxicos específicos de tumor al tumor donde se expresa el antígeno vírico por las células tumorales. Sin limitarse a teoría alguna, mediante el mecanismo de estimulación del receptor de TLR4 por GLA, se potenciará enormemente la eficacia de inmunoterapia de cáncer inducido por virus.

50 En otro aspecto de la presente divulgación, la respuesta inmunitaria de "sensibilización" puede conseguirse por transferencia adoptiva de células inmunitarias al paciente. A este respecto, las células pueden aislarse del sujeto, modificarse *ex vivo* y después transferirse de nuevo al paciente. La administración local de una composición adecuada, tal como un agonista de TLR4 (por ejemplo, GLA) u otra composición adyuvante como se describe en la presente memoria, entonces se usa para "atraer" a las células transferidas de forma adoptiva al tumor o sitio local de administración. Las células inmunitarias pueden modificarse *ex vivo* en una diversidad de maneras conocidas para los expertos en la materia, tal como expandiendo las células por diversas tecnologías para generar linfocitos T específicos de antígeno o policlonales (véase, por ejemplo, Ridell *et al.*, J. Immunol. Meth. (1990) 128:189-201; Riddell *et al.*, Science (1992) 257:238-241; US 5827642; US 6040177; US 6692964; US 6352694); modificándolas genéticamente usando tecnología de receptor antigénico quimérico (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 8906682; 8916381; 7741465; 5843728; 7446190; 6392013; la publicación internacional WO 2012/079000, la tecnología de TCR quimérico u otra modificación genética (véanse, por ejemplo, los documentos US 8741814; US 20130189309). En determinadas realizaciones, las células pueden aislarse de un donador distinto del sujeto o,

en otras realizaciones, las células pueden obtenerse de una línea células adecuada o célula artificial modificada para que sea compatible con el sujeto.

Por tanto, otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto 1) administrando al sujeto una primera composición que comprende linfocitos T específicos de antígeno asociado a tumor que se han expandido o modificado *ex vivo*, células CAR-T modificadas genéticamente que se han modificado genéticamente para que reconozcan un antígeno asociado a tumor o linfocitos T modificados genéticamente para que expresen un receptor de linfocitos T quimérico específico (TCR) que reconozca un epítipo asociado a cáncer en el contexto de MHC; 2) administrando de forma local (por ejemplo por vía intratumoral) al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado como se describe en la presente memoria para atraer las células transferidas de forma adoptiva al tumor; tratando de ese modo el cáncer en el sujeto. En determinadas realizaciones, las células transferidas de forma adoptiva pueden reforzarse administrando al sujeto un vector de expresión como se describe en la presente memoria antes de la administración local de la segunda composición para atraer las células adoptivas (y entonces reforzadas) al sitio local (por ejemplo, a un tumor).

Cánceres

Las pautas de sensibilización-atracción descritas en la presente memoria pueden ser útiles para el tratamiento de una diversidad de cánceres. En una realización, los métodos descritos en la presente memoria pueden ser útiles para el tratamiento de una diversidad de tumores sólidos, es decir, carcinomas, sarcomas y linfomas. En determinadas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido primario, y en otras determinadas realizaciones un cáncer es un tumor sólido metastásico o secundario. En determinadas realizaciones relacionadas, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer pulmonar, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, seudomixoma peritoneal, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, carcinoma escamocelular, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario y tumor de Wilms. En otras determinadas realizaciones relacionadas, la célula cancerosa se origina en un cáncer que se selecciona de tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, plasmocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oliodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom u otros cánceres. Por tanto, los métodos descritos en la presente memoria incluyen métodos para el tratamiento de, mejora de los síntomas de, e inhibición de la metástasis de cáncer, que comprende administrar inmunización "de sensibilización-atracción", en los que la primera composición de "sensibilización" o en determinadas realizaciones de "sensibilización/refuerzo" que comprende, por ejemplo, un vector de expresión recombinante que expresa un inmunógeno específico (por ejemplo, uno o más antígenos asociados a tumor) y una composición "de atracción" que comprende una agonista de TLR tal como GLA para reclutar células inmunitarias al tumor.

En determinadas realizaciones, las pautas de sensibilización-atracción descritas en la presente memoria son útiles para tratar cánceres en que los tumores son particularmente inmunógenos y en que los tumores son accesibles, tales como, aunque sin limitación, melanoma, carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer cervicouterino, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, sarcomas y cánceres esofágicos. En algunas realizaciones, la inmunogenicidad puede determinarse basándose en la heterogeneidad mutacional y/o la expresión de antígenos testiculares de cáncer y/o la expresión de antígenos víricos (por ejemplo, estrategia de vacunación de antígeno específico/neoantígeno). Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, Cancer Immunol Res. mayo de 2014; 2(5):480-6; y Lawrence *et al.*, 2013 Nature 499:214-218.

En realizaciones particulares, un cáncer inducido por virus es susceptible a tratarse o mejorarse por los métodos descritos en la presente memoria. Numerosos cánceres inducidos por virus oncógenos son conocidos en la técnica. Los cánceres inducidos por virus ejemplares que pueden tratarse o mejorarse por los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, cáncer de vejiga, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, cáncer hepático, linfoma de Burkitt, linfoma no hodgkiniano, trastorno linfoproliferativo después de trasplante, cáncer nasofaríngeo, carcinoma cervicouterino, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y leucemia/linfoma de linfocitos T en el adulto (véase, por ejemplo, Mesri *et al.*, Cell Host & Microbe 15:266-282). Puede determinarse que otros cánceres están inducidos por virus particulares, conocidos y desconocidos. Los cánceres que no se inducen por virus oncógenos también pueden tratarse usando los métodos de sensibilización-atracción descritos en la presente memoria.

Cáncer de vejiga

Un estudio reciente sugiere que el cáncer de vejiga está asociado con herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV), KSHV, también conocido como herpesvirus humano 8. En particular, se detectó ADN de KSHV en un 55 %

de los pacientes. (M. Paradžik *et al.*, Tumor Biology, 2014, 35(1), pág. 567-572). BCG induce una fuerte respuesta innata e inflamatoria en la mucosa de la vejiga, medida por la liberación de citocinas y la infiltración con neutrófilos y linfocitos T. En seres humanos, la aplicación intravesical de BCG ha demostrado provocar la inducción de un gran número de citocinas proinflamatorias y quimiocinas tales como IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , y GM-CSF (Kitamura, H., y Tsukamoto, T., Cancers (3): 3055-3072 (2011), y Agarwal, A., *et al.*, Immunopharmacol Immunotoxicol 32(2): 384-356 (2010)). En ratones, BCG regulaba por aumento significativamente genes para quimiocinas de tipo auxiliar T 1 (Th1) (Cxcl2, Cxcl9, Cxcl10, Xcl1), aumentaba la expresión de quimiocinas Th1/Th2 (RANTES, Ccl6 y Ccl7) y citocinas de polarización de Th1 (IL-1 β y TNF- α), y los genes para Fc γ -R1 e iNOS tan pronto como después de cuatro instilaciones semanales. La mayoría de estos genes permanecían altamente expresados después de 6 semanas (Scow, S.W., *et al.*, Immunology. julio de 2008;124(3):419-27 (2008)). Puede encontrarse una divulgación adicional sobre el uso de BCG como agente antitumoral, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5712123.

GLA induce fuertes respuestas de citocinas/quimiocinas en PBMC murinos *in vitro*, incluyendo quimiocinas para linfocitos T de tipo TH1 (CXCL9 y CXCL10) y leucocitos mononucleares (CCL2, CCL3), así como MCP-1, TNF α e IP-10 (Lambert, S.L., *et al.*, PLoS One; 7(12) 2012)).

GLA aplicado a la mucosa con proteína recombinante induce respuestas de anticuerpo específicas tanto locales como sistémicas y células CD4 sistémicas específicas, especialmente del fenotipo Th17, así como algunas células CD8 (Arias, M.A., *et al.*, PLoS One. 2012; 7(7): e41144 (2012)).

Los linfocitos de infiltración tumoral (TIL) se han identificado como un factor pronóstico independiente en cáncer de vejiga tan pronto como en 1978 y se demostró que los TIL CD8 eran predictivos de supervivencia en carcinoma invasivo muscular (Mostofi, L.K., y Sesterhenn, L, Natl Cancer Inst Monogr; 49: 133-141 (1978); Lopez-Beltran, a. *et al.*, Urol Int; 44: 205-209 (1989); Morita, t., *et al.* Cancer Immunol Immunother; 32: 191-194 (1990); Ikemoto, S., *et al.*, Br J Urol; 65: 333-338 (1990); Lipponen, P.K., *et al.*, Eur J Cancer; 29: 69-75 (1993); y Sharma, P., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 6 de marzo ;104(10):3967-72 (2007)). De forma importante, tanto las células CD4 como las CD8 son esenciales para la actividad antitumoral mediada por BCG y una respuesta inmunitaria Th1 predominante está asociada con tratamiento eficaz con BCG, mientras que una respuesta Th2 parece estar asociada con fracaso (Ratliff, T.L., *et al.*, J Urol; 150:1018 - 23 (1993); Riemensberger, J., *et al.*, Clin Exp Immunol; 127:20 - 6 (2002); Saint, f. *et al.*, J Urol; 167:364 - 7 (2002); de Reijke, t.M., *et al.* J Urol; 155:477 - 82 (1996); Nadler, R., *et al.*, Clin Exp Immunol; 131:206 - 16 (2003), Luo, Y., *et al.*, Cytokine; 21:17 - 26 (2003); y Bockholt, N.A., *et al.*, J Urol; 187:2228-35 (2012)). También se detectaron células dendríticas (CD1a+, CD1) en cáncer de vejiga de células transicionales, sin embargo, expresaban marcadores clásicos de activación únicamente a bajos niveles (Troy, A.J., *et al.*, J Urol., junio; 161(6): 1962-7 (1999)).

Los antígenos de testículo cancerosos (CTA) NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 y GAGE, se ha descubierto que se expresan por cánceres de vejiga, expresándose al menos un CTA en un 77 % de las muestras y expresándose dos CTA en un 61 % de los tumores (Sharma, P., *et al.*, Cancer Immun., 18 de diciembre; 3:19 (2003); y Sharma, P., *et al.*, Clin Cancer Res., 15 de septiembre; 12(18):5442-7 (2006)). De forma importante, una investigación de 69 pacientes con carcinoma urogenital para la presencia de linfocitos T CD8 intratumorales, la expresión de antígeno MHC de clase I y la expresión del NY-ESO-1, demostró que pacientes con cánceres avanzados y mayores números de TIL CD8 tenían mejor supervivencia sin enfermedad (P < 0,001) y supervivencia global (P = 0,018) que pacientes con cáncer en un estadio similar y menos TIL CD8 (Sharma, P., *et al.*, Clin Cancer Res., 15 de septiembre; 12(18):5442-7 (2006)).

Seis de seis y uno de seis pacientes con cáncer de vejiga con expresión de NY-ESO-1 montaban respuestas CD4 y CD8, respectivamente, tras inmunización intradérmica con NY-ESO-1 recombinante con adyuvante GM-CSF y BCG (Sharma, P., *et al.*, J Immunother., noviembre-diciembre; 31(9):849-57 92008)).

En ratones, los linfocitos T CD8 específicos de antígeno de migración dirigida a la vejiga y que provocan regresión tumoral podían inducirse por inmunización subcutánea y también intranasal con péptidos con adyuvante CpG (Domingos-Pereira, S., *et al.*, J Urol., 13 de agosto, 5347(13)05123-9 (2013)). Sin embargo, también se demostró en ratones que la inmunización subcutánea seguida por aplicación local de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 a la mucosa del sistema genital provocaba el reclutamiento de linfocitos T CD8 activados y el establecimiento de una combinación de linfocitos T de memoria en esta ubicación anatómica; para este tipo de inmunización se acuñó la expresión "sensibilización-atracción" por los autores (Shin, H., *et al.*, Nature, 15 de noviembre; 491(7424):463-7 (2012)). Por tanto, se ha demostrado que tanto la sensibilización mediante la vía de inmunización, así como la acción local de quimiocinas, pueden provocar el reclutamiento de linfocitos T CD8 activados a la mucosa de la vejiga.

55 Vectores de expresión recombinantes

En una realización, se proporcionan vectores de expresión recombinantes que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un inmunógeno que induce una respuesta inmunitaria al inmunógeno. Para obtener una transcripción y traducción eficaces del inmunógeno, las secuencias polinucleotídicas codificantes en cada vector deben incluir al menos una secuencia de control de la expresión apropiada (también llamada secuencia

o elemento de expresión regulador) (por ejemplo, promotor, potenciador, líder) que se describen en mayor detalle en la presente memoria, que está unida de forma funcional a la secuencia o secuencias polinucleotídicas codificantes. Estos vectores de expresión recombinantes se proporcionan, por tanto, para dirigir la expresión del inmunógeno o para dirigir la coexpresión de al menos dos inmunógenos en cualquier célula hospedadora apropiada que se haya transformado, transducido o transfectado con el vector de expresión recombinante o en que se hay introducido una partícula de vector que contenga el vector de expresión recombinante.

Los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria pueden codificar uno o más inmunógenos (es decir, al menos uno, al menos dos, al menos tres inmunógenos, etc.), que son inmunógenos que se describen en mayor detalle en otra parte en la presente memoria. En realizaciones particulares, al menos uno, dos o tres, o más inmunógenos de un virus oncógeno (por ejemplo, EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV y KSHV) pueden estar codificados por un vector de expresión recombinante. Los inmunógenos ejemplares son antígenos víricos oncógenos, incluyendo, aunque sin limitación, EBV: EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; HPV: E6, E7, E5; HBV: HBx, antígenos grande, medio, pequeño S; HCV: Core, NS3, Ns5A; HTLV: Tax, HBZ; KSHV: vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1; poliomavirus de Merkel: antígeno T grande; hCMV: pp65, IE1, US28. En otra realización específica, un vector de expresión recombinante descrito en la presente memoria puede codificar al menos uno, dos tres o más antígenos asociados a tumor. Estos antígenos asociados a tumor se describen en mayor detalle en la presente memoria y pueden ser, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor de un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de carcinoma de células de Merkel, un antígeno de carcinoma de células renales, un antígeno de cáncer de próstata (por ejemplo, fosfatasa ácida prostática, antígeno específico de próstata, NKX3.1 y antígeno de membrana específico de próstata), un antígeno de mesotelioma, un antígeno de cáncer pancreático, un antígeno de melanoma, un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer colorrectal, un antígeno de cáncer pulmonar, un antígeno de cáncer ovario o cualquier antígeno asociado a cáncer o tumor descrito en la presente memoria en la técnica.

Los vectores de expresión recombinantes pueden usarse para la expresión de uno cualquiera o más de los inmunógenos descritos en la presente memoria. En realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante se suministra a una célula apropiada (por ejemplo, una célula presentadora de antígeno, es decir, una célula que presenta un complejo de péptido/MHC en su superficie celular, tal como una célula dendrítica) o tejido (por ejemplo, tejido linfoide) que inducirá la respuesta inmunitaria deseada (es decir, una respuesta humoral específica (es decir, respuesta de linfocitos B) y/o inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células específica, que puede incluir una respuesta CTL específica de inmunógeno). Los vectores de expresión recombinantes, por lo tanto, también pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido linfoide (TRE) tales como TRE específicos de linfocitos B, linfocitos T o células dendríticas. Los TRE específicos de tejido linfoide son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Thompson *et al.* (1992), *Mol. Cell. Biol.* 12, 1043-1053; Todd *et al.* (1993), *J. Exp. Med.* 177, 1663-1674; Penix *et al.* (1993), *J. Exp. Med.* 178, 1483-1496).

En una realización particular, el vector de expresión recombinante es ADN plasmídico o ADN de cósmido. El ADN plasmídico o ADN de cósmido que contiene uno o más polinucleótidos que codifican un inmunógeno como se describe en la presente memoria se construyen fácilmente usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. El vector puede construirse típicamente en una forma de plásmido que entonces puede transfectarse en una línea celular de empaquetado o productora. El plásmido en general comprende secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias. Dichos plásmidos son bien conocidos en la técnica. Además, vectores que incluyen un origen de replicación procariota también pueden incluir un gen cuya expresión confiera un marcador detectable o de selección tal como resistencia a un fármaco. Los productos de resistencia a fármaco bacterianos típicos son aquellos que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina. Para el análisis para confirmar que se incorporan las secuencias de nucleótidos correctas en los plásmidos, el plásmido puede replicarse en *E. Coli*, purificarse y analizarse por digestión con endonucleasa de restricción y/o puede determinarse su secuencia de nucleótidos por métodos convencionales.

En otras realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante es un vector vírico. Los vectores víricos de expresión recombinantes ejemplares incluyen un vector retrovírico, un vector lentivírico, vector poxvírico, vector de virus vaccinia, vector adenovírico, vector de virus adenoasociado, vector herpesvírico y vector de alfavirus. Los vectores víricos pueden ser vivos, atenuados, de replicación condicionada o deficientes en replicación, y típicamente es un vector vírico no patógeno (defectuoso), competente en replicación.

A modo de ejemplo, en una realización específica, cuando el vector vírico comprende un vector de virus vaccinia, el polinucleótido que codifica un inmunógeno de interés puede insertarse en un sitio no esencial de un genoma de vector de virus vaccinia. Dichos sitios no esenciales se describen, por ejemplo, en Perkus *et al.*, *Virology* 152:285 (1986); Hruby *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3411 (1983); Weir *et al.*, *J. Virol.* 46:530 (1983). Los promotores adecuados para su uso con virus vaccinia incluyen, aunque sin limitación, P7.5 (véase, por ejemplo, Cochran *et al.*, *J. Virol.* 54:30 (1985); P11 (véase, por ejemplo, Bertholet, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2096 (1985)); y CAE-1 (véase, por ejemplo, Patel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9431 (1988)). Cepas altamente atenuadas de vaccinia son más aceptables para su uso en seres humanos e incluyen Lister, NYVAC, que contiene eliminaciones genómicas específicas (véase, por ejemplo, Guerra *et al.*, *J. Virol.* 80:985-98 (2006); Tartaglia *et al.*, *AIDS Research and Human Retroviruses* 8:1445-47 (1992)), o MVA (véase, por ejemplo, Gheradi *et al.*, *J. Gen. Virol.* 86:2925-36 (2005); Mayr *et al.*, *Infection* 3:6-14 (1975)). Véase también Hu *et al.* (*J. Virol.* 75:10300-308 (2001), que describen el uso de un virus de enfermedad de tipo Yaba como vector para tratamiento del cáncer); patentes de Estados Unidos

n.º 5698530 y 6998252. Véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5443964. Véanse también las patentes de Estados Unidos n.º 7247615 y 7368116.

En determinadas realizaciones, puede usarse un vector adenovírico o vector de virus adenoasociado para expresar un inmunógeno de interés. Se han descrito varios sistemas de vector adenovírico y métodos para administrar los vectores (véase, por ejemplo, Molin *et al.*, *J. Virol.* 72:8358-61 (1998); Narumi *et al.*, *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19:936-41 (1998); Mercier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6188-93 (2004); patentes de Estados Unidos n.º 6143290; 6596535; 6855317; 6936257; 7125717; 7378087; 7550296).

Los vectores retrovíricos pueden incluir aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia del simio gibbon (GaLV), retrovirus ecotrópicos, el virus de inmunodeficiencia del simio (VIS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones (véase, por ejemplo, Buchscher *et al.*, *J. Virol.* 66:2731-39 (1992); Johann *et al.*, *J. Virol.* 66:1635-40 (1992); Sommerfelt *et al.*, *Virology* 176:58-59 (1990); Wilson *et al.*, *J. Virol.* 63:2374-78 (1989); Miller *et al.*, *J. Virol.* 65:2220-24 (1991); Miller *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg, *NIH Res.* 4:43 1992; Cornetta *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 2:215 (1991)).

En una realización más específica, el vector de expresión recombinante es un vector vírico. En determinadas realizaciones, el vector vírico es un vector retrovírico y, en otra realización, el vector retrovírico es un vector lentivírico. Como entendería un experto en la materia, un vector vírico, tal como un vector lentivírico, en general se refiere a una partícula de vector vírico que comprende el genoma de vector vírico. Por ejemplo, una partícula de vector lentivírico puede comprender un genoma de vector lentivírico. Con respecto a vectores lentivíricos, el genoma del vector puede obtenerse de cualquiera de un gran número de vectores basados en genoma lentivírico disponibles y adecuados, incluyendo los identificados para aplicaciones de genoterapia humana (véase, por ejemplo, Pfeifer *et al.*, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211 (2001)). Los genomas de vector lentivírico adecuados incluyen los basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), VIH-2 virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) y virus maedi/visna. Una característica deseable de los lentivirus es que pueden infectar tanto células en división como células que no están en división, aunque las células diana no tienen que ser células en división o estar estimuladas para dividirse. En general, el genoma y las glucoproteínas de envoltura se basarán en diferentes virus, de modo que la partícula de vector vírico resultante esté pseudotipada. Se incorporan de forma deseable características de seguridad del vector vírico. Las características de seguridad incluyen LTR de autoinactivación y deficiencia de integración como se describe en mayor detalle en la presente memoria. En determinadas realizaciones, la deficiencia de integración puede conferirse por elementos del genoma del vector, pero también pueden derivar de elementos del sistema de empaquetado (por ejemplo, una proteína integrasa no funcional que puede no ser parte del genoma del vector, sino que se suministra en trans). Los vectores ejemplares contienen una señal de empaquetado (ψ), un elemento sensible a Rev (RRE), donador de corte y empalme, aceptador de corte y empalme, opcionalmente un tramo de polipurina central (cPPT) y elemento WPRE. En determinadas realizaciones ejemplares, el genoma de vector vírico comprende secuencias de un genoma lentivírico tal como el genoma de VIH-1 o el genoma de VIS. La construcción de genoma vírico puede comprender secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus, y en particular puede comprender las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o de autoinactivación de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR de VIH, VIS, VIF o VIB. Típicamente, las secuencias LTR son secuencias LTR de VIH.

El genoma del vector puede comprender un LTR 3' inactivado o de autoinactivación (véase, por ejemplo, Zufferey *et al.*, *J. Virol.* 72: 9873, 1998; Miyoshi *et al.*, *J. Virol.* 72:8150, 1998; ambos cuales están incorporados en su totalidad). Un vector de autoinactivación en general tiene una eliminación de las secuencias potenciadoras y promotoras de la repetición terminal larga (LTR) 3', que se copia en el LTR 5' durante la integración del vector. En un caso, el elemento U3 del LTR 3' contiene una eliminación de su secuencia potenciadora, la secuencia TATA, sitios Sp1 y NF-kappa B. Como resultado del LTR 3' de autoinactivación, el provirus que se genera después de la entrada y la transcripción inversa comprenderá un LTR 5' inactivado. El fundamento es mejorar la seguridad reduciendo el riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia del LTR en promotores celulares cercanos. El LTR 3' de autoinactivación puede construirse por cualquier método conocido en la técnica.

Opcionalmente, la secuencia U3 del LTR 5' lentivírico puede remplazarse con una secuencia promotora en la construcción vírica, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título del virus recuperado de la línea celular de empaquetado. También puede incluirse una secuencia potenciadora. Puede usarse cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN vírico en la línea celular de empaquetado. En un ejemplo, se usa la secuencia potenciadora/promotora de CMV (véanse, por ejemplo, las patentes de estado unidos n.º 5385839 y 5168062).

En determinadas realizaciones, se minimiza el riesgo de mutagénesis por inserción construyendo el vector lentivírico para que sea defectuoso en la integración. Puede perseguirse una diversidad de estrategias para producir un genoma de vector que no sea integrante. Estas estrategias implican el diseño de una o más mutaciones en el componente de enzima integrasa del gen pol, de modo que codifique una proteína con una integrasa inactiva. El propio genoma del vector puede modificarse para evitar la integración, por ejemplo, mutando o eliminando uno o ambos sitios de adhesión, o generando el tramo de polipurina proximal al LTR 3' (PPT) no funcional mediante eliminación o modificación. Además, están disponibles estrategias no genéticas; estas incluyen agentes

farmacológicos que inhiben una o más funciones de integrasa. Las estrategias no son mutuamente exclusivas. Es decir, puede usarse más de una de ellas a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de adhesión pueden ser no funcionales, o la integrasa y el sitio PPT pueden ser no funcionales, o los sitios de adhesión y el sitio PPT pueden ser no funcionales, o todos ellos pueden ser no funcionales.

5 La integrasa está implicada en la escisión de ADN de extremos romos bicatenario vírico y la unión de los extremos a 5'-fosfatos en las dos hebras del sitio diana cromosómico. La integrasa tiene tres dominios funcionales: dominio del extremo N, que contiene un motivo de unión a cinc (HHCC); el núcleo de dominio central, que contiene el núcleo catalítico y un motivo DD35E conservado (D64, D116, E152 en VIH-1); y un dominio del extremo C, que tiene propiedades de unión al ADN. Mutaciones puntuales introducidas en integrasa son suficientes para alterar la función normal. Se han construido y caracterizado muchas mutaciones de integrasa (véase, por ejemplo, Philpott y Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Apolonia, tesis presentada en University College London, abril de 10 2009, pág. 82-97; Engelman *et al.*, *J. Virol.* 69: 2729, 1995; Nightingale *et al.*, *Mol. Therapy*, 13: 1121, 2006). La secuencia que codifica la proteína integrasa puede eliminarse o mutarse para hacer que la proteína sea inactiva, preferiblemente sin alterar significativamente la actividad transcriptasa inversa o la dirección nuclear, evitando únicamente de ese modo la integración del provirus en el genoma de la célula diana. Mutaciones aceptables pueden reducir la catálisis de integrasa, la transferencia de hebras, la unión a sitios att, unión al ADN cromosómico hospedador y otras funciones. Por ejemplo, una única sustitución de ácido aspártico a asparagina en el resto 35 de la integrasa de VIH o VIS anula completamente la integración de ADN vírico. Las eliminaciones de integrasa generalmente estarán confinadas al dominio del extremo C. La eliminación de la secuencia codificante de los restos 235-288 produce una integrasa no funcional útil (véase, por ejemplo, Engelman *et al.*, *J. Virol.* 69:2729, 1995). Como ejemplos adicionales, pueden generarse mutaciones, por ejemplo, Asp64 (los números de restos serán para VIH-1, los números de resto correspondientes para integrasa de otros lentivirus o retrovirus pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia) (por ejemplo, D64E, D64V), Asp116 (por ejemplo, D116N), Asn120 (por ejemplo, N120K), Glu152, Gln148 (por ejemplo, Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (por ejemplo, W235E), Lys264 (por ejemplo, K264R), Lys266 (por ejemplo, K266R), Lys273 (por ejemplo, K273R). Pueden construirse otras mutaciones y ensayarse para la integración, la expresión transgénica y cualquier otro parámetro deseable. Los ensayos para estas funciones son bien conocidos. Pueden generarse mutaciones por cualquiera de una diversidad de técnicas, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio y síntesis química de secuencia de ácido nucleico. Puede generarse una mutación o puede haber más de una de estas mutaciones presentes en la integrasa. Por ejemplo, una integrasa puede tener mutaciones en dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos y así sucesivamente.

Como alternativa o en combinación con el uso de uno o más mutantes de integrasa, los sitios de adhesión (att) en U3 y U5 también puede mutarse. La integrasa se une a estos sitios y el dinucleótido del extremo 3' se escinde en ambos extremos del genoma de vector. Un dinucleótido CA está ubicado en el extremo 3' encastrado; el CA es necesario para el procesamiento, la mutación de los nucleótidos bloquea la integración en el cromosoma hospedador. La A del dinucleótido CA es el nucleótido más crítico para la integración, y mutaciones en ambos extremos del genoma darán los mejores resultados (véase, por ejemplo, Brown *et al.*, *J. Virol.* 73:9011 (1999)). En una ejemplificación, el CA en cada extremo se cambia a TG. En otras ejemplificaciones, el CA en cada extremo se cambia a TG en un extremo y GT en el otro extremo. En otras ejemplificaciones, el CA en cada extremo se elimina; en otras ejemplificaciones, la A del CA se elimina en cada extremo.

40 La integración también puede inhibirse por mutación o eliminación del tramo de polipurina (PPT) (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 2009/076524), ubicado de forma proximal al LTR 3'. El PPT es una secuencia de polipurina de aproximadamente 15 nucleótidos que puede servir como sitio de unión de cebador para la síntesis de ADN de la hebra positiva. En este caso, mutaciones o eliminaciones de PPT dirigen el proceso de transcripción inversa. Sin el deseo de estar sujeto a un mecanismo particular, mutando o eliminando PPT, se reduce de forma radical la producción de ADN lineal, y se produce esencialmente círculos de ADN 1-LTR únicamente. La integración requiere un genoma de vector de ADN bicatenario lineal, y la integración se elimina esencialmente sin ello. Como se indica en la presente memoria, un PPT puede hacerse no funcional por mutación o por eliminación. Típicamente, la totalidad de aproximadamente 15 nt del PPT se elimina, aunque en algunas realizaciones, pueden hacerse eliminaciones más cortas de 14 nt, 13 nt, 12 nt, 11 nt, 10 nt, 9 nt, 8 nt, 7 nt, 6 nt, 5 nt, 4 nt, 3 nt y 2 nt. Cuando se hacen mutaciones, típicamente se hacen múltiples mutaciones, especialmente en la mitad 5' del PPT (véase, por ejemplo, McWilliams *et al.*, *J. Virol.* 77:11150, 2003), aunque mutaciones individuales y dobles en las primeras cuatro bases aún reducirán la transcripción. Las mutaciones hechas en el extremo 3' de PPT en general tienen un efecto más drástico (véase, por ejemplo, Powell *et al.*, *J. Virol.* 70:5288, 1996).

55 Estas diferentes estrategias para preparar un genoma de vector que no se integre pueden usarse individualmente o en combinación. Puede usarse el uso de más de una estrategia para construir un vector a prueba de fallos a través de mecanismos redundantes. Por tanto, pueden combinarse mutaciones o eliminaciones de PPT con mutaciones o eliminaciones del sitio att o con mutaciones de integrasa o pueden combinarse mutaciones o eliminaciones de PPT con mutaciones o eliminaciones del sitio att y mutaciones de integrasa. Asimismo, pueden combinarse mutaciones o eliminaciones del sitio att y mutaciones de integrasa entre sí o con mutaciones o eliminaciones de PPT.

60 Como se describe en la presente memoria, las construcciones de vector lentivírico contienen un promotor para la expresión en células de mamífero. Los promotores, que se analizan en mayor detalle en la presente memoria incluyen, por ejemplo, el promotor de la ubicitina C humana (UbiC), el promotor temprano inmediato de

citomegalovirus (CMV) y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV). La región U3 puede comprender una secuencia PPT (tramo de polipurina) inmediatamente en dirección 5'. En determinadas realizaciones específicas, puede incluirse una cualquiera de al menos tres regiones U3 diferentes (en el extremo 3') en el vector lentivírico (véanse las SEQ ID NO: 21-23). Las construcciones contienen eliminaciones en las regiones U3. La construcción SIN tiene una eliminación de aproximadamente 130 nucleótidos en U3 (véase, por ejemplo, Miyoshi, *et al.* J. Virol. 72: 8150, 1998; Yu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3194, 1986), que elimina la secuencia TATA, anulando de ese modo la actividad promotora de LTR. Las eliminaciones y las construcciones 703 y 704 aumentan la expresión a partir de vectores lentivíricos (véase, por ejemplo, Bayer *et al.*, Mol. Therapy 16: 1968, 2008). Además, la construcción 704 contiene una eliminación del PPT 3', que disminuye la integración del vector (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 2009/076524). Véase también la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 12/842,609 y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US 10/042870.

Secuencias de expresión reguladoras

Como se describe en la presente memoria, el vector de expresión recombinante comprende al menos una secuencia de expresión reguladora. En determinadas realizaciones, cuando el vector de expresión recombinante comprende un genoma de vector vírico, se desea la expresión de al menos un inmunógeno en células diana particulares. Típicamente, por ejemplo, en un vector lentivírico la secuencia polinucleotídica que codifica el inmunógeno está ubicada entre las secuencias LTR 5' y LTR 3'. Además, la secuencia o secuencias de nucleótidos codificantes están preferiblemente unidas de forma funcional en una relación funcional con otras secuencias o elementos genéticos o reguladores, por ejemplos, secuencias reguladoras de la transcripción incluyendo promotores o potenciadores, que regulan la expresión del inmunógeno de una manera particular. En determinados casos, las secuencias reguladoras transcripcionales útiles son aquellas que están muy reguladas con respecto a la actividad, tanto de forma temporal como espacial. Los elementos de control de la expresión que pueden usarse para regular la expresión de los polipéptidos codificados son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción, potenciadores y otras secuencias reguladoras.

El polinucleótido que codifica el inmunógeno y cualquier otra secuencia expresable está típicamente en una relación funcional con secuencias reguladoras promotoras/potenciadoras internas. Con respecto a construcciones de vector lentivírico, un promotor/potenciador "interno" es uno que está ubicado entre las secuencias LTR 5' y LTR 3' en el vector vírico y está unido de forma funcional a la secuencia polinucleotídica codificante de interés. El promotor/potenciador interno puede ser cualquier promotor, potenciador o combinación de promotor/potenciador conocido por aumentar la expresión de un gen con el que está en una relación funcional. Una "relación funcional" y "unido de forma funcional" significan, sin limitación, que la secuencia está en la ubicación y orientación correctas con respecto al promotor y/o potenciador de modo que la secuencia de interés se expresará cuando el promotor y/o potenciador esté en contacto con las moléculas apropiadas.

La elección de un promotor/potenciador interno se basa en el patrón de expresión deseado del inmunógeno y las propiedades específicas de promotores/potenciadores conocidos. Por tanto, el promotor interno puede ser constitutivamente activo. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que puede usarse incluyen el promotor de la ubiquitina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5510474; la publicación internacional WO 98/32869; CMV (véase, por ejemplo, Thomsen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:659, 1984; patente de Estados Unidos n.º 5168062); beta-actina (Gunning *et al.* 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4831-4835); y pgk (véase, por ejemplo, Adra *et al.* 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam *et al.* 1984 Gene 32:409-417; y Dobson *et al.* 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637).

Como alternativa, el promotor puede ser un promotor específico de tejido. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de célula diana. Por ejemplo, el promotor puede ser de cualquier producto expresado por células dendríticas, incluyendo CD11c, CD103, TLR, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, receptor de manosa, Dectina-1, Clec9A, MHC de clase II. Además, pueden seleccionarse promotores para permitir la expresión inducible del inmunógeno. Se conocen en la técnica varios sistemas para la expresión inducible, incluyendo el sistema sensible a tetraciclina, el sistema represor del operador lac, así como promotores sensibles a una diversidad de cambios ambientales o fisiológicos, incluyendo choque térmico, iones metálicos, tales como promotor de metalotioneína, interferones, hipoxia, esteroides tales como progesterona o promotor del receptor de glucocorticoesteroides, radiación, tal como el promotor de VEGF. También puede usarse una combinación de promotores para obtener la expresión deseada de cada una de las secuencias polinucleotídicas codificantes de inmunógeno. Los expertos en la materia podrán seleccionar un promotor basado en el patrón de expresión deseado de la secuencia polinucleotídica en el organismo o la célula diana de interés.

Un vector de expresión recombinante, incluyendo un genoma de vector vírico, puede comprender al menos un promotor sensible a ARN polimerasa II o III. Este promotor puede estar unido de forma funcional a la secuencia polinucleotídica de interés y también puede estar unida a una secuencia de terminación. Además, puede incorporarse más de un promotor de ARN polimerasa II o III. Los promotores de ARN polimerasa II y III son bien conocidos para los expertos en la materia. Puede encontrarse una gama adecuada de promotores de ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule y White, Nucleic Acids Res., Vol. 28, pág. 1283-1298 (2000). Los promotores de ARN polimerasa II o III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o manipulado que pueda dirigir la ARN polimerasa II o III para que transcriba secuencias codificantes de ARN en dirección 3'. Además, el promotor o

promotores de ARN polimerasa II o III (Pol II o III) usados como parte del genoma de vector vírico pueden ser inducibles. Cualquier promotor de Pol II o III inducible adecuado puede usarse con los métodos descritos en la presente memoria. Los promotores de Pol II o III particularmente adecuados incluyen los promotores sensibles a tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, *Human Gene Therapy*, Vol. 11, pág. 577-585 (2000) y en Meissner *et al.*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, pág. 1672-1682 (2001).

Un potenciador interno también puede estar presente en el vector de expresión recombinante, incluyendo un genoma de vector vírico, para aumentar la expresión de la secuencia polinucleotídica de interés. Por ejemplo, puede usarse el potenciador de CMV (véase, por ejemplo, Boshart *et al.*, *Cell* 41:521, 1985). Se han identificado y caracterizado muchos potenciadores en genomas víricos, tales como VIH, CMV y en genomas de mamífero (véanse, por ejemplo, las bases de datos disponibles al público tales como GenBank). Un potenciador puede usarse en combinación con un promotor heterólogo. Un experto en la materia será capaz de seleccionar el potenciador apropiado basándose en el patrón de expresión deseado.

Cuando se dirige el suministro de un vector de expresión recombinante, incluyendo un genoma de vector vírico, a una célula diana particular, el genoma del vector habitualmente contendrá un promotor que se reconoce por la célula diana y que está unido de forma funcional a la secuencia de interés, componentes víricos (cuando el vector es un vector vírico) y otras secuencias divulgadas en la presente memoria. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ácido nucleico que permite que se produzca la unión de la ARN polimerasa y la transcripción. Los promotores pueden ser inducible, constitutivos, temporalmente activos o específicos de tejido. La actividad de los promotores inducibles se induce por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. Los promotores inducibles pueden ser una herramienta útil en la manipulación genética porque la expresión de los genes a los que están unidos de forma funcional puede activarse o desactivarse en determinadas fases del desarrollo de un organismo, su fabricación o en un tejido particular. Los promotores inducibles pueden agruparse como promotores regulados químicamente y promotores regulados físicamente. Los promotores regulados químicamente típicos incluyen, aunque sin limitación, promotores regulados por alcohol (por ejemplo, promotor del gen del alcohol deshidrogenasa I (alcA)), promotores regulados por tetraciclina (por ejemplo promotor sensible a tetraciclina), promotor regulado por esteroides (por ejemplo, promotor basado en el receptor de glucocorticoesteroides (GR) de rata, promotor basado en el receptor de estrógenos (ER) humano, promotor basado en el receptor de ecdisona de la polilla y los promotores basados en la superfamilia del receptor de esteroides/retinoides/tiroides), promotores regulados por metales (por ejemplo, promotores basados en el gen de la metalotioneína) y promotores relacionados con la patogenicidad (por ejemplo, promotores basados en proteína relacionada con patógeno (PR) del maíz y *Arabidopsis*). Los promotores regulados físicamente típicos incluyen, aunque sin limitación, promotores regulados por la temperatura (por ejemplo, promotores de choque térmico) y promotores regulados por la luz (por ejemplo, promotor de SSU de soja). Otros promotores ejemplares se describen en otra parte, por ejemplo, en las patentes y solicitudes de patente publicadas que pueden identificarse mediante búsqueda en las bases de datos de la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos.

Un experto en la materia será capaz de seleccionar un promotor apropiado basándose en las circunstancias específicas. Son bien conocidos en la técnica muchos promotores diferentes, así como métodos para unir de forma funcional el promotor a la secuencia polinucleotídica a expresar. Pueden usarse tanto secuencias promotoras nativas como muchos promotores heterólogos para dirigir la expresión en la célula de empaquetado y célula diana. Típicamente se usan promotores heterólogos porque en general permiten mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína deseada en comparación con el promotor nativo.

El promotor puede obtenerse, por ejemplo, de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus del simio 40 (SV40). El promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero heterólogo, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, un promotor de choque térmico o el promotor normalmente asociado con la secuencia nativa, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con la célula diana. En una realización, el promotor es el promotor vírico de origen natural en un sistema de expresión vírico. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de células dendríticas. El promotor específico de células dendríticas puede ser, por ejemplo, el promotor de CD11c.

La transcripción puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector o los vectores. Los potenciadores típicamente son elementos de ADN de acción en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb de longitud, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina) y de virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores adenovíricos. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia polinucleotídica específica de antígeno, pero preferiblemente está ubicada en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Estas secuencias a menudo se encuentran en las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos y son bien conocidos en la técnica.

Una construcción de expresión recombinante, incluyendo un genoma de vector vírico, también puede contener elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos que pueden incluirse en la construcción no están limitados de ninguna manera y pueden elegirse para conseguir un resultado particular. Por ejemplo, puede incluirse una señal que facilite la entrada nuclear del vector de expresión recombinante o el genoma vírico en la célula diana. Un ejemplo de dicha señal es la señal flap de VIH-1. Pueden incluirse secuencias reguladoras adicionales que faciliten la caracterización del sitio de integración del provirus en la célula diana. Por ejemplo, puede incluirse una secuencia supresora de ARNt ámbar en la construcción. También puede incluirse una secuencia aislante, por ejemplo, de β -globina de pollo, en la construcción de genoma vírico. Este elemento reduce la posibilidad de silenciamiento de un provirus integrado en la célula diana debido a metilación y efectos de heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger el potenciador interno, el promotor y secuencias polinucleótidas exógenas de efectos de posición positivos o negativos del ADN circundante en el sitio de integración en el cromosoma. Además, la construcción recombinante, incluyendo el genoma del vector, puede contener uno o más elementos genéticos diseñados para potenciar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, puede colocarse un elemento sensible al virus de la hepatitis de marmota (WRE) en la construcción (véase, por ejemplo, Zufferey *et al.* 1999. *J. Virol.* 74:3668-3681; Deglon *et al.*, 2000. *Hum. Gene Ther.* 11:179-190).

Cuando el vector de expresión recombinante es un genoma de vector vírico, el genoma de vector vírico típicamente se construye en una forma de plásmido que puede transfectarse en una línea celular de empaquetado o productora para producción de la construcción de genoma de vector vírico. El plásmido en general comprende secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias. Dichos plásmidos son bien conocidos en la técnica. Además, vectores que incluyen un origen de replicación procariota también pueden incluir un gen cuya expresión confiera un marcador detectable o de selección tal como resistencia a un fármaco. Los productos de resistencia a fármaco bacterianos típicos son aquellos que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina.

En determinadas configuraciones, los vectores de expresión recombinantes contienen secuencias polinucleótidas que codifican factores de maduración/estimuladores de células dendríticas (DC). Las moléculas estimuladoras ejemplares incluyen GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, CD40 ligando de (CD40L), CD40 inducible por fármaco (iCD40) y similares. Estos polinucleótidos típicamente están bajo el control de uno o más elementos reguladores que dirigen la expresión de las secuencias codificantes en células dendríticas. La maduración de células dendríticas contribuye a una vacunación satisfactoria (véase, por ejemplo, Banchereau *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 5:296-306 (2005); Schuler *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 15:138-147 (2003); Figdor *et al.*, *Nat. Med.* 10:475-480 (2004)). La maduración puede transformar las DC de células implicadas activamente en la captura de antígenos en células especializadas para la sensibilización de linfocitos T. Por ejemplo, el acoplamiento de CD40 por CD40L en linfocitos T auxiliares CD4 es una señal crítica para la maduración de DC, provocando la potente activación de linfocitos T CD8+. Dichas moléculas estimuladoras también se mencionan como factores de maduración o factores estimuladores de la maduración.

Los puntos de control inmunitarios representan barreras importantes para la activación de la inmunidad celular funcional que cáncer, y anticuerpos antagonistas específicos para ligandos inhibidores en linfocitos T incluyendo CTLA4 y muerte programada 1 (PD-1) son ejemplos de agentes dirigidos que se están evaluando en clínica. Un mecanismo de tolerancia importante en infecciones crónicas y cáncer es el agotamiento funcional de los linfocitos T específicos de antígeno que expresan altos niveles de PD-1. Como la potencia de la inmunización terapéutica ha demostrado potenciarse significativamente por combinación con el control de los puntos de control inmunitarios, como ejemplo no limitante, puede apreciarse por los expertos en la materia que una estrategia alternativa para inhibir el punto de control inmunitario es inhibir la expresión de ligandos de muerte programada (PD) uno y dos (PD-L1/L2). Una manera de conseguir la inhibición es mediante la expresión de moléculas de ARN tales como las descritas en la presente memoria, que reprimen la expresión de PD-L1/L2 en las DC transducidas con un genoma de vector vírico, tal como el genoma de vector lentivírico, que codifica una o más de las moléculas relevantes. La maduración de DC o la expresión de elementos particulares tales como puntos de control inmunitarios, por ejemplo, ligando de PD-1, puede caracterizarse por análisis de citometría de flujo de la regulación por aumento del marcador de superficie tal como MHC II, y perfilando las quimiocinas y citocinas expresadas, por ejemplo, realizando técnicas y métodos descritos en la presente memoria.

En otra realización, para vectores retrovíricos descritos en la presente memoria, tales como vectores lentivíricos descritos en la presente memoria, el vector lentivírico puede comprender un ácido nucleico que codifica un inmunógeno y el mismo vector lentivírico o uno diferente puede comprender un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) que se une a y bloquea la actividad de un inhibidor de punto de control. En otra realización, los vectores lentivíricos descritos en la presente memoria dirigidos a células dendríticas, pueden comprender un ácido nucleico que codifica un inmunógeno y el mismo vector lentivírico o uno diferente puede comprender un ácido nucleico que regula por disminución o inhibe de otro modo la expresión de una molécula de punto de control inmunitario expresada por la célula dendrítica.

Las moléculas de punto de control inmunitario ilustrativas que pueden abordarse por bloqueo o inhibición incluyen, aunque sin limitación, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de CD2 de moléculas y se expresa en todos los linfocitos T NK, $\gamma\delta$ y CD8+ de memoria ($\alpha\beta$)), CD160 (también mencionado como BY55) y CGEN-15049. Los inhibidores de punto de control inmunitario incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno

de los mismos, u otras proteínas de unión, que se unen a y bloquean o inhiben la actividad de uno o más de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 y CGEN-15049. Los inhibidores de punto de control inmunitario ilustrativos incluyen Tremelimumab (anticuerpo de bloqueo de CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), ipilimumab, MK-3475 (bloqueante de PD-1), Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y Yervoy/ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4).

Una secuencia que codifica un producto detectable, habitualmente una proteína, puede incluirse para permitir la identificación de células que están expresando el inmunógeno expresado. Por ejemplo, una proteína marcadora fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde (GFP), se incorpora en la construcción de expresión recombinante junto con una secuencia polinucleotídica de interés (es decir, que codifica al menos un inmunógeno). En otros casos, la proteína puede ser detectable por un anticuerpo, o la proteína puede ser una enzima que actúa sobre un sustrato para producir un producto detectable, o puede ser un producto proteínico que permite la selección de una célula diana transfectada o transducida, por ejemplo, confiere resistencia a un fármaco, tal como resistencia a higromicina. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas adecuadas para su uso en células eucariotas, por ejemplo, neomicina, metotrexato, blastidina, entre otros conocidos en la técnica, o deficiencias auxotróficas complementarias o suministro de nutrientes críticos retenidos del medio. El marcador de selección opcionalmente puede estar presente en un plásmido diferente o introducirse por cotransfección.

Con respecto a partículas de vector descritas en la presente memoria, puede usarse una o más unidades de expresión multicistónicas que incluyen dos o más de una secuencia polinucleotídica que codifica un inmunógeno y una secuencia que codifica una molécula de envoltura como se describe en la presente memoria o uno o más factores de maduración de DC necesarios para la producción de la partícula de vector deseada en células de empaquetado. El uso de vectores multicistónicos reduce el número total de moléculas de ácido nucleico requeridas y, por tanto, puede evitar las posibles dificultades asociadas con la coordinación de la expresión de múltiples genomas de vector. En un vector multicistónico, los diversos elementos a expresar están unidos de forma funcional a uno o más promotores (y otros elementos de control de expresión según lo necesario). En algunas configuraciones, un vector multicistónico comprende una secuencia que codifica al menos un inmunógeno (es decir, uno o más) de interés, una secuencia que codifica un producto indicador y una secuencia que codifica uno o más componentes de la partícula de vector. En determinadas realizaciones en que la construcción recombinante comprende un polinucleótido que codifica un inmunógeno, la construcción opcionalmente codifica un factor de maduración de DC. En determinadas realizaciones, la construcción recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno vírico oncógeno y un antígeno asociado a tumor. En otras determinadas realizaciones, un vector multicistónico comprende una secuencia polinucleotídica que codifica cada uno de un inmunógeno, un factor de maduración de DC y opcionalmente componentes víricos cuando el vector de expresión es un vector de expresión vírico.

Cada componente a expresar en un vector de expresión multicistónico puede estar separado, por ejemplo, por un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) a un elemento 2A vírico, para permitir la expresión separada de las diversas proteínas a partir del mismo promotor. Los elementos IRES y los elementos 2A son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4937190; de Felipe *et al.* 2004. *Traffic* 5: 616-626). En una realización, se usan oligonucleótidos tales como secuencias del sitio de escisión por furina (RAKR) (véase, por ejemplo, Fang *et al.* 2005 *Nat. Biotech.* 23: 584-590) unidas con secuencias de tipo 2A del virus de la glosopeda (FMDV); virus de rinitis equina A (ERAV); y virus thosa asigna (TaV) (véase, por ejemplo, Szymczak *et al.* 2004 *Nat. Biotechnol.* 22: 589-594) para separar elementos genéticos en un vector multicistónico. La eficacia de un vector multicistónico particular puede ensayarse fácilmente detectando la expresión de cada uno de los genes usando protocolos convencionales.

En una ejemplificación específica, un genoma de vector vírico comprende: una secuencia potenciadora/promotora de citomegalovirus (CMV); las secuencias R y U5 del LTR de 5' de VIH; una secuencia de empaquetado (ψ); opcionalmente la señal flap de VIH-1; un potenciador interno; un promotor interno; un gen de interés; el elemento sensible a virus de la hepatitis de marmota; una secuencia supresora de ARNt ámbar; un elemento U3 con una eliminación de su secuencia potenciadora; el aislante de β -globina de pollo; y las secuencia R y U5 del LTR de VIH 3'. En algunas ejemplificaciones, el genoma de vector comprende un LTR 5' lentivírico intacto y un LTR 3' de autoinactivación (véase, por ejemplo, Iwakuma *et al.* *Virology* 15:120, 1999).

La construcción del genoma de vector puede conseguirse usando cualquier técnica de genomanipulación adecuada conocida en la técnica incluyendo, sin limitación, las técnicas convencionales de digestión con endonucleasa de restricción, ligamiento, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ejemplo, como se describe en Sambrook *et al.* (ediciones de 1989 y 2001; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Coffin *et al.* (*Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)); y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000).

También pueden usarse vectores construidos para expresión transitoria en células de mamífero. La expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que puede replicarse de forma eficaz en una célula hospedadora,

de modo que la célula hospedadora acumule muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetice altos niveles del polipéptido codificado por el polinucleótido específico de inmunógeno en el vector de expresión. Véase, Sambrook *et al.*, *supra*, pág. 16.17-16.22, 1989. Otros vectores y métodos adecuados para la adaptación a la expresión de polipéptidos son bien conocidos en la técnica y se adaptan fácilmente a las circunstancias específicas.

- 5 Usando los contenidos proporcionados en la presente memoria y el conocimiento en la técnica, un experto en la materia reconocerá que la eficacia de un sistema de expresión particular puede ensayarse transfectando células de empaquetado con un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína indicadora y midiendo la expresión usando una técnica adecuada, por ejemplo, midiendo la fluorescencia de un conjugado de proteína fluorescente verde. Otros genes indicadores adecuados son bien conocidos en la técnica.
- 10 Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un inmunógeno puede usarse para la producción del inmunógeno. Los vectores de expresión recombinantes incluyen al menos una secuencia de expresión reguladora, tal como un promotor o potenciador que está unido de forma funcional al polinucleótido que codifica el inmunógeno. Cada uno de los vectores de expresión puede usarse para transformar, transducir o transfectar una célula hospedadora apropiada para la producción recombinante de un inmunógeno respectivo. Las células hospedadoras adecuadas para producción del inmunógeno incluyen procariontes, levaduras y células eucariotas superiores (por ejemplo, CHO y COS). El inmunógeno puede aislarse de la célula hospedadora respectiva o el cultivo de células hospedadoras usando uno cualquiera de una diversidad de métodos de aislamiento (por ejemplo, filtración, diafiltración, cromatografía (incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta presión) y electroforesis preparativa) conocidos y puestos en práctica de forma rutinaria en la técnica de proteínas. En determinadas realizaciones, como se describe en la presente memoria, el inmunógeno aislado entonces puede formularse con un excipiente farmacéuticamente adecuado para proporcionar una composición inmunógena.

Los métodos particulares para producir polipéptidos de forma recombinante se general son bien conocidos y usados de forma rutinaria. Por ejemplo, se describen procedimientos de biología molecular por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989; véase también Sambrook *et al.*, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (2001)). La secuenciación de ADN puede realizarse como se describe en Sanger *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)) y el manual de secuenciación plc de Amersham International e incluyendo mejoras al mismo.

Partículas de vector

- 30 En otra realización, se proporcionan partículas de vector. Una partícula de vector comprende uno cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria, que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un inmunógeno. En otras determinadas realizaciones, una partícula de vector comprende un sistema de expresión recombinante que comprende un vector de expresión recombinante (también llamado un primer vector de expresión recombinante) que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un inmunógeno que induce una respuesta inmunitaria específica. También se proporcionan en la presente memoria métodos para suministrar un polinucleótido que codifica al menos un inmunógeno (como se describe en la presente memoria) a una célula diana. En realizaciones particulares, la célula diana es una célula inmunitaria que es una célula presentadora de antígeno; en realizaciones más específicas y como se describe en la presente memoria, la célula diana es una célula dendrítica. Dichos métodos comprenden poner en contacto (es decir, permitir la interacción) de la célula diana con un vehículo que suministra el polinucleótido. En realizaciones particulares, descritas en detalle en la presente memoria, los métodos para suministro del polinucleótido comprenden poner en contacto la célula administrando a un sujeto una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica el inmunógeno. Las partículas de vector, los vectores de expresión recombinantes, los polinucleótidos y los inmunógenos se analizan en mayor detalle en la presente memoria.

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno esenciales para el inicio y control de las respuestas inmunitarias. Las DC pueden desarrollarse a lo largo de dos rutas: una ruta es independiente de monocitos y la segunda ruta deriva de monocitos (Mo-DC). Los monocitos sanguíneos, tras el cultivo con GM-CSF e IL-4 adquieren una morfología dendrítica y fuertes capacidades para iniciar la inmunidad adaptativa (véase, por ejemplo, Bender, *et al.*, J. Immunol. Methods 196(2), 121 (1996); Sallusto *et al.*, J. Exp. Med. 179(4), 1109 (1994), incluyendo *in vivo* se seres humanos (véase, por ejemplo, Dhodapkar, *et al.*, J. Clin. Invest 104(2), 173 (1999); Schuler-Thurner, *et al.*, J. Immunol. 165(6), 3492 (2000)). Una respuesta de linfocitos T específica de inmunógeno más eficaz puede conseguirse usando una vacuna de partícula de vector, en particular un sistema de partícula de vector lentivírico que suministra de forma eficaz inmunógenos directamente a Mo-DC *in vivo*, sin la necesidad de manipulación celular *ex vivo*. Las Mo-DC humanas expresan altos niveles de dos receptores de lectina de tipo C, el receptor de manosa (MMR) y la molécula de adhesión intercelular 3-sin acoplamiento de integrina específica de DC (DC-SIGN). Como se describe en mayor detalle en la presente memoria, la expresión de inmunógenos puede estar dirigida al Mo-DC usando un vector lentivírico recombinante manipulado para estar dirigido a DC-SIGN.

Una envoltura dirigida a DC-SIGN, SVGmu, que consiste en una glucoproteína de virus Sindbis (SIN) manipulada que se une selectivamente a DC-SIGN, se ha modificado como se describe (véase la descripción de la presente

memoria y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 12/842609 y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US10/042870). El vector lentivírico indujo respuestas inmunitarias de linfocitos T CD8 altamente funcionales después de una única inmunización en ratones (véase, por ejemplo, Dai, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (2009); Yang, *et al.*, Nat. Biotechnol. 26(3), 326 (2008)). Este prototipo se ha hecho avanzar significativamente mediante dos modificaciones principales. Este vector lentivírico descrito en la presente memoria comprende una envoltura de glucoproteína (llamada SINvar1) basada en SIN nativo, un arbovirus conocido por infectar DC dérmicas mediante el receptor de DC-SIGN (véase, por ejemplo, Gardner, *et al.*, J. Virol. 74(24), 11849 (2000); Klimstra, *et al.*, J. Virol. 77(22), 12022 (2003)) que está modificado para evitar la unión a receptores de sulfato de heparano ubicuos (véase, por ejemplo, Klimstra *et al.*, J. Virol. 72(9), 7357 (1998)). La envoltura de SINvar1 confiere tanto productividad aumentada como función *in vivo* en comparación con la envoltura de SVGmu precursora. El vector también es incompetente en integración de forma redundante mediante la combinación de una integrasa mutante (polD64V), que hace que sea no funcional (véase, por ejemplo, Apolonia, *et al.*, Mol. Ther. 15(11), 1947 (2007)), y una estructura de vector con la región U3 eliminada del LTR (hasta att) y el tramo de polipurina (PPT) del LTR 3'. Por tanto, además de una integrasa deshabilitada, la composición de la estructura de vector evita la transcripción del genoma del vector de longitud completa (mutación de autoinactivación) que produce círculos de ADNbc episómicos transcritos de forma inversa de un LTR en la DC infectada, que no son un molde para la integración cromosómica (véase, por ejemplo, Bayer, *et al.*, Mol. Ther. 16(12), 1968 (2008); Breckpot *et al.*, J. Virol. (2010); Ma *et al.*, Mol. Ther. 10(1): 139 (2004)). Aproximadamente un 75 % del genoma de VIH precursor se ha eliminado de DC-NILV, incluyendo todas las proteínas reguladoras y accesorias excepto Rev. Después de una única inyección, DC-NILV induce una respuesta de linfocitos T CD8 específica de antígeno tumoral altamente robusta. La potencia de la vacunación con vector lentivírico depende al menos en parte del acoplamiento de los receptores de reconocimiento de patrones TLR3 y TLR7 (véase, por ejemplo, Beignon *et al.*, J. Virol. (2009); Breckpot *et al.*, *supra*). DC-NILV puede inducir respuestas inmunitarias de magnitud equivalente a su equivalente de integración y puede usarse en una pauta de sensibilización-refuerzo homóloga.

En determinadas realizaciones, la partícula de vector es una partícula de vector vírico y en otras determinadas realizaciones, la partícula de vector es una partícula derivada de una bacteria tal como, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Mycobacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, y *Yersinia spp.* (véase, por ejemplo, Paterson, Semin. Immunol (2010) 22:183; Loessner, Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4:157; Daudel, Expert Rev. Vaccines (2007) 6:97). Las partículas de vector vírico ejemplares incluyen una partícula de vector lentivírico que comprende un genoma de vector lentivírico; una partícula de vector poxvírico que comprende un genoma de vector poxvírico; una partícula de vector de virus vaccinia que comprende un genoma de vector de virus vaccinia; una partícula de vector adenovírico que comprende un genoma de vector adenovírico; una partícula de vector de virus adenoasociado que comprende un genoma de vector de virus adenoasociado; una partícula de vector herpesvírico que comprende un genoma de vector herpesvírico (por ejemplo, virus del herpes simple I o II); o una partícula de vector de alfavirus que comprende un genoma de vector de alfavirus.

En una realización y más particular, la partícula de vector es una partícula de vector lentivírico que comprende un genoma de vector lentivírico (que se describe en detalle anteriormente). Se proporcionan métodos y composiciones en la presente memoria para dirigirse a células y dirigirse a células dendríticas (DC) en particular usando una partícula de vector lentivírico (que también puede llamarse virión, partícula lentivírica) para suministrar una secuencia que codifica al menos un inmunógeno a DC. La partícula de vector lentivírico comprende una variante de glucoproteína de envoltura derivada de E2 del virus Sindbis, y una construcción de expresión recombinante que comprende el genoma que incluye las secuencias de interés y, opcionalmente, otros componentes. La variante de glucoproteína muestra unión reducida a sulfato de heparano en comparación con la glucoproteína de HR, una cepa de virus Sindbis de referencia. La glucoproteína de envoltura facilita la infección de células dendríticas por las partículas de vector lentivírico. "Facilita" la infección, tal como se usa en la presente memoria, es lo mismo que facilita la transducción y se refiere a la función de la glucoproteína de envoltura, actuando en solitario o en concierto con otras moléculas, para promover o potenciar la entrada mediada por receptor de una partícula de retrovirus o lentivirus seudotipada en una célula diana.

En general, las partículas de vector lentivírico se producen por una línea celular que contiene uno o más vectores plasmídicos y/o elementos integrados que juntos codifican los componentes necesarios para generar partículas de vector funcionales. Estas partículas de vector lentivírico típicamente no son competentes en la replicación, es decir, solamente tienen capacidad para una única ronda de infección. Muy a menudo, múltiples vectores plasmídicos o casetes de expresión individuales integrados de forma estable en el cromosoma de la célula productora se utilizan para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas de vector lentivírico; sin embargo, puede usarse un único vector plasmídico que tenga todos los componentes lentivíricos. En una ejemplificación, la línea celular de empaquetado se transfecta con uno o más plásmidos que contienen el genoma de vector vírico, incluyendo LTR, una secuencia de empaquetado de acción en *cis* y las secuencias de interés (es decir, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un inmunógeno), al menos un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (por ejemplo, gag y pol) y al menos un plásmido que codifica una glucoproteína de envoltura de arbovirus. Las partículas víricas brotan a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que incluye típicamente dos genomas de ARN que contienen las secuencias de interés y una glucoproteína de envoltura de arbovirus dirigida a células dendríticas. En determinadas realizaciones, la glucoproteína de arbovirus es una glucoproteína E2 del virus Sindbis y la glucoproteína se manipula para que tenga unión reducida a sulfato de

heparano en comparación con E2 de la cepa de referencia HR. Esto implica habitualmente al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de glucoproteína E2 de HR. Además, la glucoproteína E2 puede manipularse para aumentar la especificidad de diana a células dendríticas.

5 Sin el deseo de limitarse a teórica alguna, se cree que la unión de la partícula vírica a una superficie celular induce endocitosis, llevando el virus al interior de una endosoma, activando la fusión de membrana y permitiendo que el núcleo del virus entre en el citosol. Para determinadas realizaciones, que utilizan partículas de vector lentivírico de integración, después de la transcripción inversa y la migración del producto al núcleo, el genoma del virus se integra en el genoma de la célula diana, incorporando las secuencias de interés en el genoma de la célula diana. Para reducir la posibilidad de mutagénesis por inserción y para promover la expresión transitoria de uno o más inmunógenos designados, sin embargo, otras realizaciones utilizan partículas de vector lentivírico no integrantes (es decir, aquellas que no se integran en el genoma de la célula diana), sino que en su lugar expresan las secuencias de interés a partir de una episoma. En cualquier caso, la DC infectada entonces se expresa en las secuencias de interés (por ejemplo, un inmunógeno y opcionalmente una molécula estimuladora). El inmunógeno entonces puede procesarse por las células dendríticas y presentarse a linfocitos T y B, generando una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La ruta específica descrita anteriormente no es necesaria siempre que la célula dendrítica pueda estimular una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

Las partículas víricas pueden administrarse a un sujeto para proporcionar un efecto profiláctico o terapéutico. Después de la infección de las células dendríticas y la expresión del producto inmunógeno, se genera una respuesta inmunitaria contra los productos.

20 *Envoltura de vector vírico*

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) son virus que se transmiten a un hospedador, tal como seres humanos, caballos o aves mediante un vector de artrópodo infectado tal como un mosquito. Los arbovirus se dividen además en subfamilias de virus incluyendo alfavirus y flavivirus, que tienen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva y una envoltura que contiene glucoproteína. Por ejemplo, el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo occidental pertenecen a la familia flavivirus, y el virus Sindbis, el virus Semliki Forest y el virus de la encefalitis equina venezolana son miembros de la familia alfavirus (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, J. Virol. 66, 4992 (1992)). La envoltura del virus Sindbis incluye dos glucoproteínas transmembranarias (véase, por ejemplo, Mukhopadhyay *et al.* Nature Rev. Microbiol. 3, 13 (2005)): E1 que se cree responsable de la fusión y E2 que se cree responsable de la unión celular. Las glucoproteínas de la envoltura del virus Sindbis se sabe que seudotipan otros retrovirus, incluyendo oncorretrovirus y lentivirus.

Como se analiza en la presente memoria, una glucoproteína de envoltura de arbovirus puede usarse para seudotipar un genoma de vector basado en lentivirus. Un lentivirus "seudotipado" es una partícula lentivírica que tiene una o más glucoproteínas de envoltura que están codificadas por un virus que es distinto del genoma lentivírico. La glucoproteína de envoltura puede modificarse, mutarse o manipularse como se describe en la presente memoria. Por tanto, las partículas de vector lentivírico descritas en la presente memoria incluyen lentivirus seudotipado con una glucoproteína de envoltura de arbovirus, por ejemplo, una glucoproteína de envoltura de alfavirus o flavivirus, por ejemplo, una glucoproteína E2 que puede modificarse, mutarse o manipularse. Los lentivirus también pueden seudotiparse con otras envolturas, incluyendo VSV-G, virus en la gripe, arenavirus, rabdovirus, ortomixovirus, VIH1, VIH2 y VIS.

40 La envoltura del virus Sindbis y otros alfavirus se incorpora en la bicapa lipídica de la membrana de partícula vírica, y típicamente incluye múltiples copias de dos glucoproteínas, E1 y E2. Cada glucoproteína tiene regiones que abarcan la membrana; E2 tiene un dominio citoplásmico de aproximadamente 33 restos mientras que la cola citoplásmica de E1 es muy corta (aproximadamente de 2 restos). Tanto E1 como E2 tienen ácidos palmíticos adheridos en o cerca de las regiones que abarcan la membrana. E2 se sintetiza inicialmente como una proteína precursora que se escinde por furina u otra serina proteínasa dependiente Ca²⁺ en E2 y una pequeña glucoproteína llamada E3. Ubicada entre las secuencias que codifican E2 y E1 hay una secuencia que codifica una proteína llamada 6K. E3 y 6K son secuencias señal que sirven para traslocar las glucoproteínas E2 y E1, respectivamente, a la membrana. En el genoma del virus Sindbis, la región codificante de las proteínas de la envoltura de Sindbis incluye la secuencia que codifica E3, E2, 6K y E1. Como se usa en la presente memoria, la "envoltura" de un virus arbovirus incluye al menos E2 y también puede incluir E1, 6K y E3. Una secuencia ejemplar de glucoproteínas de envoltura del virus Sindbis, cepa HR, está representada como la SEQ ID NO: 17. Las secuencias de las glucoproteínas de envoltura para otros arbovirus pueden encontrarse en bases de datos disponibles al público, tales como GenBank. Por ejemplo, pueden encontrarse secuencias que codifican glucoproteínas del virus del dengue en el acceso GQ252677.1 (entre otros en GenBank) y en la base de datos de variación de virus en NCBI y una secuencia ejemplar que codifica las glucoproteínas de la envoltura del virus de la encefalitis equina venezolana en el acceso NP_040824.1.

Aunque el receptor o receptores celulares en células dendríticas para alfavirus y virus Sindbis en particular no se han identificado de forma definitiva hasta la fecha, un receptor parece ser DC-SIGN (véase, por ejemplo, Klimstra *et al.*, J. Virol. 77:12022, 2003). El uso de los términos "adhesión", "unión", "dirección" y similares se usan indistintamente y no significa que indiquen un mecanismo de la interacción entre la glucoproteína de la envoltura del

virus Sindbis y un componente celular. DC-SIGN (ICAM-3 (molécula de adhesión intracelular 3)-sin acopamiento de integrina específica de célula dendrítica; también conocido como CD209) es un receptor de tipo lectina de tipo C con capacidad de unión rápida y endocitosis de materiales (véase, por ejemplo, Geijtenbeek *et al.* Annu. Rev. Immunol. 22: 33-54, 2004). Parece que E2 dirige el virus a células dendríticas a través de DC-SIGN. Como se muestra en la presente memoria, las células que expresan DC-SIGN se transducen por partículas de vector vírico pseudotipadas con E2 de virus Sindbis mejor (al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces mejor) que las células isogénicas que no expresan DC-SIGN. El mecanismo de la manera en que la glucoproteína E2 facilita la infección vírica parece implicar DC-SIGN, posiblemente a través de la unión directa a DC-SIGN o causando un cambio en la conformación o algún otro mecanismo. Independientemente del mecanismo real, la dirección por E2 es preferente para células que expresan DC-SIGN, concretamente células dendríticas.

También parece que el virus Sindbis se une a células mediante sulfato de heparano (véase, por ejemplo, Klimstra *et al.*, J. Virol. 72: 7357, 1998; Burmes *et al.*, J. Virol. 72: 7349, 1998). Como el sulfato de heparano y otros glucosaminoglucanos de superficie celular se encuentran en la superficie de la mayoría de tipos celulares, es deseable reducir la interacción entre el sulfato de heparano y las glucoproteínas de la envoltura de Sindbis. Esto puede conseguirse disminuyendo la unión de la envoltura del virus Sindbis al sulfato de heparano o aumentando la unión, por ejemplo, aumentando la avidéz de la envoltura del virus Sindbis por las células dendríticas o ambas. Como resultado, la unión no específica a otras moléculas, que pueden expresarse por otros tipos celulares y que pueden existir incluso si la envoltura es específica para DC-SIGN, se reduce, y la especificidad mejorada puede servir para evitar efectos secundarios indeseados, tales como efectos secundarios que pueden reducir la respuesta inmunitaria deseada o efectos secundarios asociados con transducción inespecífica de otros tipos celulares. Como alternativa o adicionalmente a las ventajas de transducción relativamente específica de células que expresan DC-SIGN, las partículas víricas pseudotipadas con glucoproteína E2 de la envoltura del virus Sindbis pueden ofrecer otras ventajas sobre las partículas víricas pseudotipadas con glucoproteínas tales como VSV-G. Los ejemplos de dichas ventajas incluyen lisis mediada por el complemento reducida y/o dirección a células neurales reducida, que se cree que ambas están asociadas con la administración de partículas víricas pseudotipadas de VSV-G.

En diversas ejemplificaciones, las partículas de vector lentivírico se unen específicamente a células que expresan DC-SIGN y tienen unión reducida o anulada a sulfato de heparano. Es decir, una glucoproteína E2 de envoltura del virus Sindbis puede modificarse para que dirija preferentemente el virus a células dendríticas que expresan DC-SIGN respecto a otros tipos celulares. Dichas glucoproteínas de envoltura preferentemente se unen a células dendríticas, especialmente células dendríticas que expresan DC-SIGN, con respecto a otros tipos celulares que expresan de forma ubicua sulfato de heparano, tal como células mieloides o linfoides. Como se describe a continuación, esta unión preferente provoca de forma ideal una infección preferente de las células dendríticas, especialmente aquellas que expresan DC-SIGN. Basándose en la información obtenida de estudios estructurales y modelado molecular entre otros estudios, se diseñan secuencias variantes de proteínas de envoltura, especialmente glucoproteínas E2 y E1, y se generan de modo que las glucoproteínas mantengan sus funciones como proteínas de envoltura, pero tienen la especificidad de unión, avidéz o nivel de unión deseado.

Pueden crearse secuencias variantes candidatas para cada glucoproteína y ensayarse usando los métodos descritos a continuación, u otros métodos conocidos en la técnica, para identificar glucoproteínas de envoltura con las características más deseables.

Determinadas secuencias variantes de E2 de Sindbis tienen al menos una alteración de aminoácido en el resto 160 en comparación con la SEQ ID NO: 1. El resto 160 se elimina o cambia a un aminoácido distinto de ácido glutámico. Una alteración es muy habitualmente una sustitución de al menos un aminoácido, pero como alternativa puede ser una adición o eliminación de uno o más aminoácidos. Preferiblemente, cualquier aminoácido adicional es de bajo número y no comprende un epítipo antigénico (por ejemplo, secuencia de marca de hemaglutinina), que puede comprometer la seguridad. Cuando hay dos o más alteraciones, ambas pueden ser del mismo tipo (por ejemplo, sustitución) o de tipos diferentes (por ejemplo, una sustitución y una eliminación). Múltiples alteraciones pueden estar dispersada o ubicadas de forma contigua en la secuencia proteínica.

A modo de ejemplo, las secuencias variantes comprenden al menos una alteración de aminoácido en la región de aproximadamente el resto 50 a aproximadamente el resto 180 de la SEQ ID NO: 1. Dentro de esta región hay aminoácidos que están implicados en la unión al sulfato de heparano. Reduciendo la carga positiva neta de E2, puede reducirse la interacción electrostática con sulfato de heparano, provocando unión disminuida a su sulfato de heparano. Los aminoácidos cargados positivamente candidatos en esta región incluyen lisinas en los restos 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149, 159 y arginina en los restos 65, 92, 128, 137, 157, 170, 172 (véase, por ejemplo, Bear *et al.*, Virology 347: 183-190, 2006) (véase la SEQ ID NO: 1). Al menos varios de estos aminoácidos están implicados directamente en la unión de E2 a sulfato de heparano. La carga positiva neta puede reducirse por eliminación de lisina o arginina o sustitución de lisina o arginina con un aminoácido neutro o cargado negativamente. Por ejemplo, una o más de estas lisinas y argininas pueden remplazarse con ácido glutámico o aspártico. Determinadas realizaciones tienen al menos una sustitución de lisina 70, 76 o 159. Las secuencias de aminoácido ejemplares de la glucoproteína E2 se exponen en las SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, restos 66 a 488), 4 (por ejemplo, restos 66 a 488) y 5 (por ejemplo, restos 66 a 486). En casos donde se expresa E2 como una poliproteína con E3, la lisina ubicada adyacente al sitio de escisión de E3/E2 natural se mantiene, es decir, la

secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión están inalterados. Como alternativa, la secuencia del sitio de escisión por endopeptidasa nativa se reemplaza con una secuencia de reconocimiento para una endopeptidasa diferente.

5 También se modifican determinadas variantes de E2 de manera que afecte positivamente a la unión a las células dendríticas. La alteración del ácido glutámico encontrado en el resto 160 en la secuencia de HR de referencia puede mejorar la unión a células dendríticas (véase, por ejemplo, Gardner *et al.*, J. Virol. 74, 11849, 2000). Se encuentran alteraciones, tales como una eliminación del resto 160 o sustitución del resto 160 en determinadas variantes. En variantes particulares, se sustituye un aminoácido no cargado en el lugar Glu, en otras variantes, se sustituye un aminoácido no ácido en el lugar de Glu. Típicamente, Glu 160 se reemplaza con uno de los aminoácidos pequeños o alifáticos, incluyendo glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina.

10 Otras variantes comprenden dos o más alteraciones de aminoácido. Típicamente, es estas variantes una de las alteraciones es Glu 160 y la alteración o alteraciones restantes son cambios de una o más de las lisinas y argininas en la región que abarca de aproximadamente el resto 50 a aproximadamente 180 de la SEQ ID NO: 1. Determinadas variantes comprenden una alteración de Glu 160 en un resto no ácido o eliminación y una o más alteraciones de lisina 70, lisina 76 o lisina 159 con un aminoácido no básico. Algunas variantes específicas comprenden Glu 160 a Gly, Lys 70 a Glu y Lys 159 a Glu; Glu 160 a Gly, Lys 70, 76 y 159 a Glu; una eliminación de Glu 160 y Lys 70 y 159 a Glu; y una eliminación de Glu 160 y Lys 70, 76 y 159 a Glu. Se entiende que la numeración de las posiciones usada en la presente memoria se hace con referencia a la SEQ ID NO: 1, de modo que, por ejemplo, si un aminoácido se elimina o inserta, la numeración se ajusta en consecuencia. Por ejemplo, si el resto 1 está ausente, entonces la posición 160 se refiere a la posición 159.

15 En determinadas realizaciones, la proteína E2 en primer lugar se expresa como una poliproteína en fusión con al menos E3 o en fusión con una secuencia líder. Independientemente de si la secuencia líder es E3 u otra secuencia, E2 en la envoltura vírica debe estar libre de E3 u otra secuencia líder. En otras palabras, E2 preferiblemente no es una proteína de fusión de E3/E2 (por ejemplo, la proteína de fusión de E3/E2 llamada SVGmu). En determinadas realizaciones, E2 se expresa como parte de la poliproteína de E3-E2-6K-E1. El virus Sindbis expresa de forma natural E2 como parte de una poliproteína y las regiones de unión para E3/E2, E2/6K y 6K/E1 tienen secuencias reconocidas y escindidas por endopeptidasas. Normalmente, la unión de E3/E2 se escinde por furina o una serina endopeptidasa de tipo furina entre los restos 65 y 66. La furina tiene especificidad por restos de arginina emparejados que están separados por dos aminoácidos. Para mantener la escisión de E3/E2 por furina, los restos 20 62-66 (RSKRS; SEQ ID NO: 26) deben mantener los dos restos de arginina con dos aminoácidos de separación y el resto de serina. Como alternativa, puede usarse una secuencia de escisión diferente en lugar de la secuencia de escisión por furina de E3/E2 o cualquiera de las otras secuencias de escisión. Pueden incorporarse sitios de reconocimiento y escisión para endopeptidasas incluyendo, sin limitación endopeptidasas aspárticas (por ejemplo, catepsina D, quimosina, proteasa de VIH), endopeptidasas de cisteína (bromelinas, papaína, calpaína), metaloendopeptidasas (por ejemplo, colagenasa, termolisina), endopeptidasas de serina (por ejemplo, quimotripsina, factor IXa, factor X, trombina, tripsina), estreptocinasas. Las secuencias del sitio de reconocimiento y escisión para estas enzimas son bien conocidas.

25 También pueden alterarse aminoácidos en E2, distintos de los ya mencionados. En general, una secuencia de E2 variante tendrá al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de E2 de referencia, o puede tener al menos un 82 %, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % de identidad de secuencia. Por tanto, cualquiera de las glucoproteínas E2 variantes descritas anteriormente, con cualquiera de las mutaciones descritas anteriormente (incluyendo, aunque sin limitación, la mutación en la posición 160, o en una o más de las lisinas y argininas en la región que abarca del resto aproximadamente 50 a aproximadamente 180, por ejemplo, 70, 76 y/o 159) pueden tener al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de E2 de referencia, por ejemplo, la secuencia de la glucoproteína E2 madura de la SEQ ID NO: 1, 3 (por ejemplo, los restos 66 a 488), 4 (por ejemplo, los restos 66 a 488) o 5 (por ejemplo, los restos 66 a 486).

30 La glucoproteína variante debe mostrar función biológica, tal como la capacidad de facilitar la infección de células dendríticas por una partícula vírica que tiene una envoltura que comprende E2. Los experimentos han identificado regiones de glucoproteínas de envoltura que parecen tener una función importante en diversos aspectos del ensamblaje del virus, la adhesión a la superficie celular y la infección. Cuando se generan variantes, puede usarse la siguiente información como directriz. La cola citoplásmica de E2, aproximadamente los restos 408 a 415, es importante para el ensamblaje del virus (véase, por ejemplo, West *et al.* J. Virol. 80: 4458-4468, 2006; incorporado en su totalidad). Otras regiones están implicadas en la formación de estructura secundaria (aproximadamente los restos 33-53) e implicadas en el transporte y la estabilidad de la proteína (aproximadamente los restos 86-119) (véase, por ejemplo, Navaratmarajah *et al.*, J. Virol. 363:124-147, 2007; incorporado en su totalidad). La variante puede retener el carácter hidrófobo de una región que abarca la membrana, aproximadamente los restos 370-380. La variante puede retener uno o ambos restos de los sitios de glucosilación ligada a N NIT (restos (196-198) y NFT (restos 318-320) y puede retener uno o más de los sitios que están palmitoilados (C-396, C416 y C417) (véase, por ejemplo, Strauss *et al.*, Microbiol. Rev. 58, 491-562, 1994; pág. 499-509). Por otro lado, muchas regiones de E2 pueden alterarse sin eventos perjudiciales. Por ejemplo, las inserciones de transposones en muchas ubicaciones diferentes en E2 aún producían virus viable (véase, por ejemplo, Navaratmarajah, *supra*).

En determinadas realizaciones, puede incorporarse un péptido de marca en las proteínas E3, 6K o E1. Para algunos propósitos, puede incorporarse una marca en E2, pero no es deseable una marca para su uso en un producto para la administración a pacientes humanos. Un péptido de marca, que es una secuencia corta (por ejemplo, 5-30 aminoácidos), puede usarse para facilitar la detección de la expresión de la envoltura y su presencia en partículas víricas. Para propósitos de detección, una secuencia de marca típicamente será detectable por anticuerpos o agentes químicos. Otro uso para una marca es facilitar la purificación de partículas víricas. Puede usarse un sustrato que contenga un compañero de unión para la marca para absorber el virus. La elución del virus puede conseguirse por tratamiento con un resto que desplaza la marca del compañero de unión o cuando la secuencia de marca está en unión con una secuencia de escisión, el tratamiento con la endopeptidasa apropiada permitirá convenientemente la liberación del virus. (Véase, por ejemplo, catálogo de QiaGEN®, sistema de proteasa de Factor Xa). La eliminación del péptido de marca en general es deseable por motivos de seguridad de las partículas de virus usadas en sujetos animales. Si la marca no se elimina, puede producirse una respuesta inmunitaria contra la marca.

Las marcas adecuadas incluyen, sin limitación, FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 35) (patente de Estados Unidos n.º 4703004, incorporada en su totalidad), para la que hay anticuerpos disponibles en el mercado, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, glutatión S-transferasa, poli(His) (patente de Estados Unidos n.º 4569794, incorporada en su totalidad), tiorredoxina, marca de HA (hemaglutinina), entre otras. Poli(His) puede absorberse en medio de afinidad que contenga iones metálicos unidos, tales como níquel o cobalto, y puede eluirse con un medio de ajo pH.

Las partículas de vector pueden evaluarse para determinar la especificidad de la glucoproteína de envoltura incorporada en el virus dirigido a células dendríticas. Por ejemplo, puede obtenerse una población mixta de células de médula ósea de un sujeto y cultivarse *in vitro*. Como alternativa, pueden obtenerse y usarse líneas celulares isogénicas que expresan o no expresan DC-SIGN. El virus recombinante puede administrarse a la población mixta de células de médula ósea o líneas celulares isogénicas, y puede ensayarse la expresión de un gen indicador incorporado en el virus en las células cultivadas. Determinadas realizaciones pueden emplear un análisis de dilución limitante, en que la población mixta de células se divide en partes diferentes, que después se incuban por separado con cantidades decrecientes de virus (por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces menos de virus en cada parte). En algunas realizaciones, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % de las células infectadas en la población mixta de células son células dendríticas que expresan DC-SIGN. En determinadas realizaciones, la relación de células dendríticas infectadas a células dendríticas no infectadas (o células que no expresan DC-SIGN) es de al menos aproximadamente 2:1, al menos aproximadamente 3:1, al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 9:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 30:1, al menos aproximadamente 40:1, al menos aproximadamente 50:1, al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 500:1, al menos aproximadamente 1000:1, al menos aproximadamente 5000:1, al menos aproximadamente 10,000:1 o más. Para la dilución limitante, la mayor selectividad se observa típicamente a diluciones más altas (es decir, cantidades menores) de virus introducido.

La actividad de partículas víricas seudotipadas puede determinarse por cualquiera de una diversidad de técnicas. Por ejemplo, un método preferido para medir la eficacia de infectividad (UI, unidades infecciosas) es administrando partículas víricas a células y midiendo la expresión de un producto codificado en el genoma del vector. Puede usarse cualquier producto que pueda ensayarse. Un tipo conveniente de producto es una proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP). Otros productos que pueden usarse incluyen proteínas expresadas en una superficie celular (por ejemplo, detección por unión de anticuerpo), enzimas y similares. Si el producto es un antígeno y las células son células dendríticas, la infectividad/actividad puede evaluarse determinando una respuesta inmunitaria. Además, es posible averiguar los efectos secundarios en un mamífero. La capacidad de dirigirse específicamente a células dendríticas también puede ensayarse directamente, por ejemplo, en cultivo celular como se describe a continuación.

Las partículas de vector, que incluyen las partículas víricas descritas en la presente memoria también pueden prepararse y ensayarse para su selectividad y/o su capacidad de facilitar la penetración de la membrana celular diana. Las partículas víricas que tienen una envoltura con glucoproteínas no modificadas pueden usarse como controles para comparaciones. En resumen, las células que expresan un receptor para una glucoproteína de envoltura se infectan por el virus usando un ensayo de infección convencional. Después de un tiempo específico, por ejemplo, 48 horas después de la infección, las células pueden recogerse y puede determinarse el porcentaje de células infectadas por el virus por citometría de flujo, por ejemplo. La selectividad puede puntuarse calculando el porcentaje de células infectadas por el virus. Asimismo, el efecto de una glucoproteína de envoltura variante en el título de virus puede cuantificarse dividiendo el porcentaje de células infectadas por el virus que comprende una envoltura variante entre el porcentaje de células infectadas por el virus que comprende la glucoproteína de envoltura de tipo silvestre (no modificada) correspondiente. Una variante particularmente adecuada tendrá la mejor combinación de selectividad y título infeccioso. Una vez seleccionada una variante, pueden realizarse ensayos de concentración de virus para confirmar que estos virus pueden concentrarse sin comprometer la actividad. Los sobrenadantes de virus se recogen y concentran por ultracentrifugación. Los títulos de virus pueden determinarse por dilución limitante de la disolución madre de virus y la infección de las células que expresan el receptor para la glucoproteína de envoltura, midiendo la expresión de un producto expresado por los virus como se describe

anteriormente.

La entrada de una partícula de vector lentivírico en una célula diana es otro tipo de evaluación de la actividad. La proteína de fusión BlaM-Vpr (beta-lactamasa Vpr) se ha usado para evaluar la penetración del virus VIH-1; una fusión de BlaM y una glucoproteína de envoltura del virus Sindbis, tal como E1 o una proteína de fusión de E2/E1 puede usarse para evaluar la eficacia de una proteína de envoltura para facilitar la fusión y penetración en una célula diana. Las partículas víricas pueden prepararse, por ejemplo, por transfección transitoria de células de empaquetado con uno o más vectores que comprenden los elementos víricos, BlaM-Vpr, y la envoltura variante de interés (y una molécula de afinidad si fuera apropiado). Los virus resultantes pueden usarse para infectar células que expresan una molécula, la molécula de dirección (o molécula de afinidad) se une específicamente en ausencia o presencia del inhibidor libre de unión (tal como un anticuerpo). Las células entonces pueden lavarse con medio independiente de CO₂ y cargarse con tinte CCF2 (Aurora Bioscience). Después de incubación a temperatura ambiente para permitir que se complete la reacción de escisión, las células pueden fijarse por paraformaldehído y analizarse por citometría de flujo y microscopía. La presencia de células azules indica la penetración de virus en el citoplasma; se esperarían menos células azules cuando se añade anticuerpo de bloqueo (véase, por ejemplo, Cavrois *et al.*, Nat. Biotechnol. 20:1151-54, 2002).

Para investigar si la penetración es dependiente de un pH bajo, y para identificar las glucoproteínas de envoltura con la dependencia de pH deseada, puede añadirse NH₄Cl y otro compuesto que altere el pH en la etapa de infección (NH₄Cl neutralizará los compartimentos ácidos de los endosomas). En el caso de NH₄Cl, la desaparición de células azules indicará que la penetración de virus es dependiente de pH bajo. Además, para confirmar que la actividad es dependiente del pH, pueden añadirse agentes lisosomotrópicos, tales como cloruro de amonio, cloroquina, concanamicina, bafilomicina A1, monensina, nigericina, etc., al tampón de incubación. Estos agentes elevan el pH dentro de los compartimentos endosómicos (véase, por ejemplo, Drose *et al.*, J. Exp. Biol. 200, 1-8, 1997). El efecto inhibitorio de estos agentes revelará la función del pH para la fusión y entrada del virus. La diferente cinética de entrada entre virus que presentan diferentes moléculas fusogénicas puede compararse y seleccionarse la más adecuada para una aplicación particular.

Pueden utilizarse ensayos de entrada basados en PCR para controlar la transcripción inversa y medir la cinética de la síntesis de ADN vírico como indicación de la cinética de la entrada del virus. Por ejemplo, se incuban partículas víricas que comprenden una molécula de proteína de envoltura particular con células diana, tales como células 293T, DC o cualquier otra célula que se haya manipulado para que exprese, o que exprese de forma natural, el compañero de unión apropiado (receptor) para la molécula de proteína de envoltura. Inmediatamente, o después de un incremento de tiempo (para permitir que se produzca la infección), se retiran los virus no unidos y se analizan alícuotas de las células para los ácidos nucleicos víricos. Se extrae el ADN de estas alícuotas y se somete a análisis de amplificación, en general en un ensayo semicuantitativo, cebado con cebadores específicos de LTR. La aparición de productos de ADN específicos de LTR indica el éxito de la entrada del virus.

Después de la infección vírica con la partícula de vector vírico, se expresa el inmunógeno por las células dendríticas diana. Si se ponen en contacto *ex vivo*, las células dendríticas diana entonces se transfieren de nuevo al paciente, por ejemplo, por inyección, donde interactúan con células inmunitarias que pueden generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno deseado. En realizaciones preferidas, el virus recombinante se inyecta en el paciente donde transduce las células dendríticas diana *in situ*. Las células dendríticas entonces expresan el antígeno particular asociado con una enfermedad o trastorno a tratar, y el paciente puede montar una respuesta inmunitaria eficaz contra la enfermedad o trastorno.

El genoma de vector vírico puede contener una secuencia polinucleotídica que codifica más de un inmunógeno, y tras la transducción de una célula dendrítica, generar respuestas inmunitarias contra cada inmunógeno suministrado a la célula. En algunas realizaciones, los inmunógenos están relacionados con una única enfermedad o trastorno. En otras realizaciones, los inmunógenos están relacionados con múltiples enfermedades o trastornos.

En algunas de las partículas de vector, se suministran factores de maduración de DC que activan y/o estimulan la maduración de las DC junto con la secuencia codificantes de inmunógeno de interés. En determinadas realizaciones alternativas, las DC se activan por suministro de factores de maduración de DC antes de, simultáneamente con o después del suministro de las partículas de vector. Los factores de maduración de DC pueden proporcionarse por separado de la administración de las partículas de vector.

Como se describe en la presente memoria, uno o más factores de inmunomodulación o maduración de DC pueden estar codificados por una o más secuencias que están contenidas en la partícula de vector y expresarse después de que la partícula entre o infecte una célula dendrítica. Las secuencias que codifican factores de inmunomodulación también pueden proporcionarse en un vector diferente que se cotransfecta con la partícula de vector que codifica uno o más inmunógenos en una línea celular de empaquetado.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para inmunoterapia adoptiva en un sujeto. Como se describe anteriormente, se identifica un inmunógeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Se obtiene un polinucleótido que codifica el inmunógeno o inmunógenos deseados y se empaqueta en una partícula de vector. Se obtienen células dendríticas diana del paciente y se transducen con la partícula de vector que contiene un

polinucleótido que codifica el inmunógeno deseado. Las células dendríticas entonces se transfieren de nuevo al paciente.

Las partículas de vector (por ejemplo, las partículas de vector vírico descritas en la presente memoria) pueden inyectarse *in vivo*, donde las partículas infectan DC y suministran la secuencia de nucleótidos que codifica inmunógeno de interés. La cantidad de partículas víricas es al menos 3X106 unidades infecciosas (UI) y puede ser de al menos 1X107 UI, al menos 3X107 UI, al menos 1X108 UI, al menos 3X108 UI, al menos 1X109 UI, o al menos 3X109 UI. A intervalos seleccionados, las DC de los órganos linfoides destinatarios pueden usarse para medir la expresión, por ejemplo, observando la expresión del marcador, tal como GFP o luciferasa si se coexpresa por una secuencia polinucleotídica presente en el vector de expresión recombinante incluido en la partícula de vector. Las técnicas de control de ácido nucleico y las mediciones de actividad transcriptasa inversa (RT) también pueden usarse para analizar la biodistribución de las partículas de vector cuando la partícula de vector es una partícula de vector lentivírico. Los linfocitos T de leucocitos mononucleares de sangre periférica, ganglios linfáticos, bazo o tejido maligno o infectado con patógeno diana de destinatarios tratados con partícula de vector (incluyendo partícula de vector lentivírico) pueden medirse a partir de la magnitud y durabilidad de la respuesta a la estimulación con antígeno. Las células tisulares diferentes de DC, tales como células epiteliales y células linfoides, pueden analizarse para la especificidad de suministro génico *in vivo*.

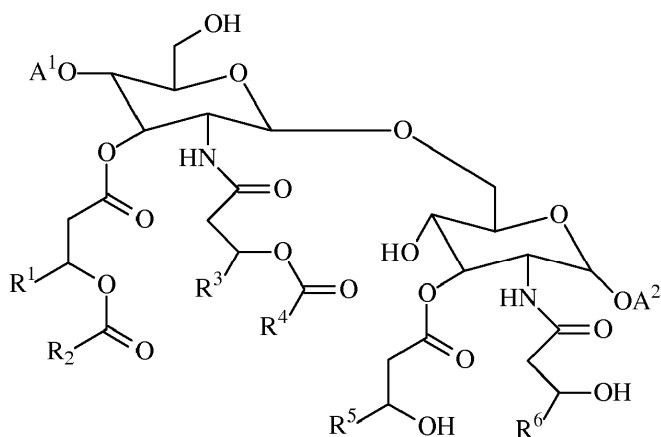
Adyuvantes y composiciones adyuvantes

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden la administración a un sujeto de al menos una composición que comprende un adyuvante que está destinado a "atraer" las células inmunitarias sensibilizadas a un sitio local de administración, en particular al sitio de un tumor. En otra realización, las composiciones que comprenden el adyuvante comprenden además un inmunógeno, en determinadas realizaciones, el inmunógeno de la "sensibilización". Dichas composiciones que comprenden un adyuvante no pueden comprender un inmunógeno y, por tanto, en determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden el adyuvante están sustancialmente desprovistas de inmunógeno. En determinadas realizaciones, el adyuvante potencia (o mejora, aumenta) la respuesta inmunitaria al inmunógeno (es decir, aumenta el nivel de la respuesta inmunitaria específica al inmunógeno de una manera estadística, biológica o clínicamente significativa en comparación con el nivel de la respuesta inmunitaria específica en ausencia de administración del adyuvante). Los métodos y técnicas para determinar el nivel de una respuesta inmunitaria se analizan en mayor detalle en la presente memoria y se ponen en práctica de forma rutinaria en la técnica.

Los adyuvantes ejemplares que pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación necesaria a los siguientes. Los adyuvantes que pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria incluyen adyuvantes que pueden ser útiles para potenciar la respuesta CTL al inmunógeno (o a la célula o partícula que contiene inmunógeno) y/o potenciar la respuesta de linfocitos T CD4 de memoria. En determinadas realizaciones, los adyuvantes para su uso en los métodos de la presente memoria inducen una respuesta de citocinas para reclutar linfocitos T, en particular, linfocitos T específicos de antígeno a un sitio de administración local. En otra realización, los adyuvantes para su uso en los métodos de la presente memoria aumentan la respuesta al inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que podrían afectar de forma adversa a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio, tales como alumbre (sulfato de potasio y aluminio) u otros adyuvantes que contienen aluminio; adyuvantes relacionados con lípido A atóxicos tales como, a modo de ejemplo no limitante, monofosforil lípido A atóxico (véase, por ejemplo, Tomai *et al.*, J. Biol. Response Mod. 6:99-107 (1987)), GLA descrito en la presente memoria; monofosforil lípido A (MPL) 3 Des-O-acilado (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Reino Unido n.º GB 2220211); adyuvantes tales como QS21 y QuilA que comprenden un glucósido triterpeno o saponina aislada de la corteza del árbol *Quillaja saponaria Molina* encontrado en Sudamérica (véase, por ejemplo, Kensil *et al.*, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (ed. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de Estados Unidos n.º 5057540). Otros adyuvantes adecuados incluyen emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con inmunoestimulantes, tales como monofosforil lípido A (véase, por ejemplo, Stoute *et al.*, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante adecuado es CpG (Bioworld Today, 15 de noviembre de 1998). Otras adyuvantes adecuados incluyen agonistas del receptor de tipo Toll y miméticos de lípido A tales como aminoalquil glucosamínido 4-fosfatos (AGP) (véase, por ejemplo, RC527 descrito en Baldrige *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 4(7): 1129-1138 (2004), y RC-544 descrito en Persing *et al.*, Trends in Microbiology, 10(10) (supl.): S32-S37 (2002)).

Como se describe en la presente memoria, un adyuvante adecuado es una sal de aluminio, tal como un hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como poliácido glutámico o pollisina. Otra clase de adyuvantes adecuados es formulaciones de emulsión de aceite en agua (también llamadas en la presente memoria emulsiones de aceite en agua estables). Dichos adyuvantes pueden usarse opcionalmente con otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramide™), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (1)

- MF59 (publicación internacional WO 90/14837), que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de Tween 80 y un 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.); (2) SAF, que contiene un 10 % de escualano, un 0,4 % de Tween 80, un 5 % de polímero L121 bloqueado con pluronic y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y (3) sistema adyuvante Ribi (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene un 2 % de escualeno, un 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL) trehalosa dimicolato (TDM) y estructura de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL+CWS (Detox™). También como se describe anteriormente, los adyuvantes adecuados incluyen adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir del mismo tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund (CFA) (que es adecuado para uso no humano, pero no para uso humano) y adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).
- Otro adyuvante que puede usarse en las composiciones descritas en la presente memoria se identifica por la fórmula química (I) y se menciona como glucopiranosil lípido A (GLA):



(I)

- en el que los restos A1 y A2 se seleccionan independientemente del grupo de hidrógeno, fosfato y sales de fosfato. El sodio y el potasio son contraiones ejemplares para las sales de fosfato. Los restos R1, R2, R3, R4, R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo de hidrocarbilo que tiene de 3 a 23 carbonos, representado por C3-C23. Para mayor claridad, se explicará que cuando un resto se "selecciona independientemente de" un grupo especificado que tiene múltiples miembros, debe entenderse que el miembro elegido para el primer resto no afecta de ninguna manera o limita la elección del miembro seleccionado del segundo resto. Los átomos de carbono a los que se unen R1, R3, R5 y R6 son asimétricos y, por tanto, pueden existir en la estereoquímica R o S. En una realización, todos esos átomos de carbono están en estereoquímica R, mientras que en otra realización todos esos átomos de carbono están en estereoquímica S.

- "Hidrocarbilo" se refiere a un resto químico formado completamente de hidrógeno y carbono, donde la disposición de los átomos de carbono puede ser cadena lineal o ramificados, no cíclicos o cíclicos, y la unión entre los átomos de carbono adyacentes puede ser completamente de enlaces sencillos, es decir, para proporcionar un hidrocarbilo saturado, o pueden ser dobles o triples enlaces presenten entre dos átomos de carbono cualesquiera, es decir, para proporcionar un hidrocarbilo insaturado, y el número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbilo es entre 3 y 24 átomos de carbono. El hidrocarbilo puede ser un alquilo, donde los alquilos de cadena lineal representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares, incluyendo undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, etc.; mientras que los alquilos ramificados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo y similares. Los hidrocarbilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los hidrocarbilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares. Los hidrocarbilos insaturados contienen al menos un doble o triple enlace entre átomos de carbono adyacentes (mencionados como "alqueno" o "alquino", respectivamente, si el hidrocarbilo no es cíclico, y cicloalqueno y cicloalquino, respectivamente, si el hidrocarbilo es al menos parcialmente cíclico). Los alquenos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares; mientras que los alquinos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares.

- El adyuvante de fórmula (I) puede obtenerse por métodos sintéticos conocidos en la técnica, por ejemplo, la metodología sintética divulgada en la publicación internacional PCT n.º WO 2009/035528, así como las

publicaciones identificadas en la publicación internacional WO 2009/035528. Determinados adyuvantes también pueden obtenerse en el mercado. Un adyuvante preferido es el producto n.º 699800 identificado en el catálogo de Avanti Polar Lipids, Alabaster AL (véase E1 en combinación con E10, a continuación).

5 En diversas realizaciones de la invención, el adyuvante tiene la estructura química de fórmula (I), pero los restos A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 y R6 se seleccionan de subconjuntos de las opciones previamente proporcionadas para estos restos, en los que estos subconjuntos se identifican a continuación por E1, E2, etc.

E1: A1 es fosfato o sal de fosfato y A2 es hidrógeno.

E2: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C3-C21; y R2 y R4 son hidrocarbilo C5-C23.

E3: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C5-C17; y R2 y R4 son hidrocarbilo C7-C19.

10 E4: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C7-C15; y R2 y R4 son hidrocarbilo C9-C17.

E5: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C9-C13; y R2 y R4 son hidrocarbilo C11-C15.

E6: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C9-C15; y R2 y R4 son hidrocarbilo C11-C17.

E7: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C7-C13; y R2 y R4 son hidrocarbilo C9-C15.

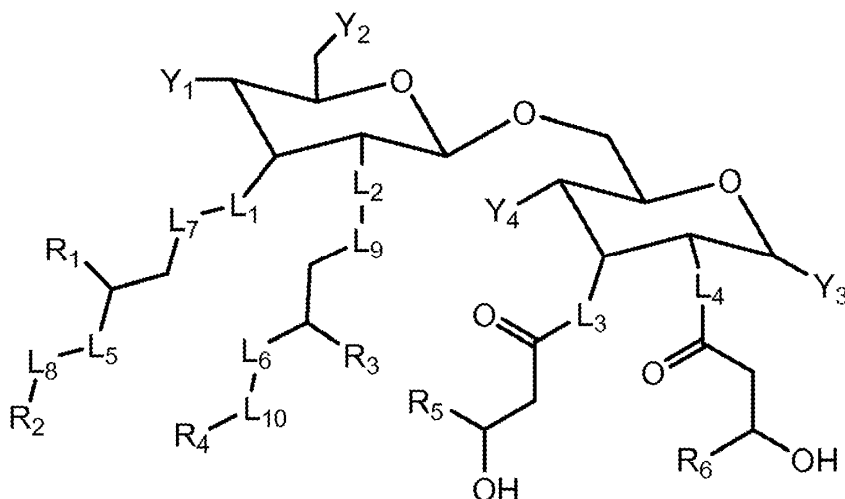
E8: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C11-C20; y R2 y R4 son hidrocarbilo C12-C20.

15 E9: R1, R3, R5 y R6 son alquilo C11; y R2 y R4 son hidrocarbilo C13.

E10: R1, R3, R5 y R6 son undecilo y R2 y R4 son tridecilo.

20 En determinadas realizaciones, E1 puede combinarse con cada uno de E2 a E10. Los grupos hidrocarbilo de E2 a E9 pueden ser grupos alquilo, preferiblemente grupos alquilo de cadena lineal. En determinadas realizaciones, E1 se combina con cada uno de E2 a E10 y cada uno de E2 a E9 son grupos alquilo. En determinadas realizaciones, E1 se combina con cada uno de E2 a E10 y cada uno de E2 a E9 son grupos alquilo de cadena lineal. El adyuvante de fórmula (I) puede formularse en una composición farmacéutica, opcionalmente con un coadyuvante, cada uno como se describe a continuación. A este respecto, se hace referencia a la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0131466 que proporciona formulaciones, tal como formulación acuosa (AF) y formulaciones de emulsión estable (SE) para el adyuvante GLA, en la que estas formulaciones pueden usarse para cualquiera de los adyuvantes de fórmula (I).

25 En otra realización, el adyuvante es un adyuvante de tipo lípido A sintético como se describe en la publicación internacional PCT n.º 2010/141861 y tiene una estructura seleccionada de la siguiente fórmula química (II):



30 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, en la que: L1, L2, L3, L4, L5 y L6 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -O-, -NH- y -(CH2)-; L7, L8, L9 y L10 son iguales o diferentes y en cada ocasión puede estar ausente o ser -C(=O)-; Y1 es un grupo funcional ácido; Y2 e Y3 son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente de -OH-, -SH y un grupo funcional ácido; Y4 es -OH o -SH; R1, R3, R5 y R6 son iguales o diferentes y se selecciona cada uno independientemente del grupo de alquilo C8-C13; y R2 y R4 son iguales o diferentes y se selecciona cada uno independientemente del grupo de alquilo C6-C11.

35 Opcionalmente, como se describe en mayor detalle a continuación y en la presente memoria, pueden usarse simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes, tal como, a modo de ejemplo no limitante, una sal de aluminio

con MPL, una sal de aluminio con QS21, MPL con QS21 y sal de aluminio alúmina, QS21 y MPL juntos. Además, puede usarse adyuvante incompleto de Freund (véase, por ejemplo, Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de una sal de aluminio, QS21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

- 5 En determinadas realizaciones, el adyuvante de fórmula (I) puede formularse en un agente farmacéutico (o composición adyuvante), opcionalmente con un coadyuvante como se describe anteriormente, cada uno como se analiza a continuación y cualquier otro adyuvante descrito en la presente memoria disponible en la técnica. A este respecto, se hace referencia a la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0131466 que proporciona formulaciones, tal como formulación acuosa (AF) y formulaciones de emulsión estable (SE) para el adyuvante GLA, que son formulaciones que pueden usarse con respecto a cualquiera de los adyuvantes de fórmula (I).

10 Como se proporciona en la presente memoria, el adyuvante de fórmula I puede usarse en combinación con un segundo adyuvante, mencionado en la presente memoria como coadyuvante. En tres realizaciones ejemplares, el coadyuvante puede ser un sistema de suministro, o puede ser un inmunopotenciador, o puede ser una composición que funciona como sistema de suministro y también como inmunopotenciador (véase, por ejemplo, O'Hagan *et al.*, *Pharm. Res.* 21(9):1519-30 (2004)). El coadyuvante puede ser un inmunopotenciador que funciona mediante un miembro de las biomoléculas de la familia del receptor de tipo Toll. Por ejemplo, el coadyuvante puede seleccionarse por su modo principal de acción, como un agonista de TLR4 o un agonista de TLR8 o un agonista de TLR9. Como alternativa, o adicionalmente, el coadyuvante puede seleccionarse por sus propiedades transportadoras; por ejemplo, el coadyuvante puede ser una emulsión, un liposoma, una micropartícula o alumbre.

15 En una realización, el coadyuvante es alumbre, donde este término se refiere a sales de aluminio, tales como fosfato de aluminio (AIPO₄) e hidróxido de aluminio (Al(OH)₃). Cuando se usa alumbre como coadyuvante, el alumbre puede estar presente en una dosis de vacuna en una cantidad de aproximadamente de 100 a 1000 µg, o de 200 a 800 µg, o de 300 a 700 µg o de 400 a 600 µg. El adyuvante de fórmula (1) típicamente está presente en una cantidad menor que la cantidad de alumbre, y en diversas realizaciones específicas, el adyuvante de fórmula (1) en una base ponderal, está presente a un 0,1-1 % o un 1-5 % o un 1-10 % o un 1-100 % con respecto al peso de alumbre.

20 En una realización particular, el adyuvante es una emulsión que tiene propiedades adyuvantes para vacuna. Dicha emulsión incluye emulsiones de aceite en agua. El adyuvante incompleto de Freund (IFA) es uno de dichos adyuvantes. Otra emulsión de aceite en agua adecuada es el adyuvante MF-59TM, que contiene escualeno, monooleato de polioxietilensorbitán (también conocido como tensioactivo TweenTM 80) y trioleato de sorbitán. El escualeno es un compuesto orgánico natural originalmente obtenido de aceite de hígado de tiburón, aunque también está disponible de fuentes vegetales (principalmente aceites vegetales) incluyendo semilla de amaranto, salvado de arroz, germen de trigo y olivas. Otros adyuvantes adecuados son adyuvantes MontanideTM (Seppic Inc., Fairfield NJ) incluyendo MontanideTM ISA 50V, que es adyuvante basado en aceite de vaselina; MontanideTM ISA 206; y MontanideTM IMS 1312. Aunque el aceite de vaselina puede estar presente en el coadyuvante, en una realización el componente o componentes oleosos de las composiciones de vacuna de la presente invención son todos aceites metabolizables.

25 Los ejemplos de inmunopotenciadores que pueden usarse en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria como coadyuvantes incluyen: MPLTM; MDP y derivados; oligonucleótidos; ARN bicatenario; patrones moleculares asociados a patógeno alternativos (PAMPS); saponinas; inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP); citocinas; y quimiocinas.

30 En una realización, el coadyuvante es adyuvante MPLTM, que está disponible en el mercado en GlaxoSmithKline (originalmente desarrollado por Ribi ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, MT). Véase, por ejemplo, Ulrich y Myers, Capítulo 21 de *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell y Newman, ed. Plenum Press, Nueva York (1995). Relacionados con el adyuvante MPLTM, y también como coadyuvantes adecuados para su uso en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, están el adyuvante AS02TM y el adyuvante AS04TM. El adyuvante AS02TM es una emulsión de aceite en agua que contiene tanto adyuvante MPLTM como adyuvante QS-21TM (una adyuvante de saponina analizado en otra parte en la presente memoria). El adyuvante AS04TM contiene adyuvante MPLTM y alumbre. El adyuvante MPLTM se prepara a partir de lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella minnesota* R595 tratando LPS con hidrólisis ácida y básica suave seguida de purificación del LPS modificado.

35 En otra realización, el coadyuvante es una saponina tal como las derivadas de la corteza de la especie de árbol *Quillaja saponaria*, o una saponina modifica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5057540; 5273965; 5352449; 5443829; y 5560398). El producto adyuvante QS-21TM vendido por Antigenics, Inc. Lexington, es un adyuvante que contiene saponina ejemplar que puede usarse con el adyuvante de fórmula (I). Un coadyuvante alternativo, relacionado con las saponinas, es la familia de adyuvantes ISCOMTM, originalmente desarrollados por Iscotec (Suecia) y típicamente formados a partir de saponinas derivados de *Quillaja saponaria* o análogos sintéticos, colesterol y fosfolípido, todos formados en una estructura de tipo panal de abeja.

En otra realización más, el coadyuvante es una citocina que funciona como coadyuvante (véase, por ejemplo, Lin *et al.*, Clin. Infect. Dis. 21(6):1439-49 (1995); Taylor, Infect. Immun. 63(9):3241-44 (1995); y Egilmez, Capítulo 14 en Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, John Wiley & Sons, Inc. (2007)). En diversas realizaciones la citocina puede ser, por ejemplo, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (véase, por ejemplo, Change *et al.*, Hematology 9(3):207-15 (2004); Dranoff, Immunol. Rev. 188:147-54 (2002); y la patente de Estados Unidos 5679356); o un interferón, tal como un interferón de tipo I (por ejemplo, interferón- α (IFN- α) o interferón- β (IFN- β)), o un interferón de tipo II (por ejemplo, interferón- γ (IFN- γ) (véase, por ejemplo, Boehm *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 15:749-95 (1997); y Theofilopoulos *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 23:307-36 (2005)); una interleucina, incluyendo específicamente interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2) (véase, por ejemplo, Nelson, J. Immunol. 172(7):3983-88 (2004); interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-12 (IL-12) (véase, por ejemplo, Portielje *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 52(3): 133-44 (2003); y Trinchieri, Nat. Rev. Immunol. 3(2):133-46 (2003)); interleucina-15 (IL-15), interleucina-18 (IL-18); ligando de tirosina cinasa 3 hepática fetal (Flt3L) o factor de necrosis tumoral α (TNF α). El adyuvante de fórmula (I) puede coformularse con la citocina antes de la combinación con el antígeno de vacuna, o el antígeno, adyuvante de fórmula (I) y coadyuvante de citocina pueden formularse por separado y después combinarse.

En determinadas realizaciones, como se proporciona en la presente memoria, los adyuvantes descritos en la presente memoria en la fórmula I o II pueden usarse en combinación con otro agente terapéutico. En una realización, las composiciones adyuvantes de la presente memoria se administran, en realizaciones particulares en un sitio local tal como como el sitio de un tumor, en combinación con uno o más inhibidores del punto de control inmunitario. Los puntos de control inmunitario se refieren a una diversidad de rutas inhibitorias del sistema inmunitario que son cruciales para mantener la autotolerancia y para modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias. Los tumores usan determinadas rutas de punto de control inmunitario como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria, particularmente contra linfocitos T que son específicos para antígenos tumorales (véase, por ejemplo, Pardoll, 2012 Nature 12:252; Chen y Mellman 2013 Immunity 39:1). La presente divulgación proporciona inhibidores del punto de control inmunitario que pueden administrarse en combinación con las composiciones adyuvantes, en particular sin antígeno. Dichas politerapias trabajan en concierto potenciando una respuesta inmunitaria antineoplásica. Determinados virus también han desarrollado mecanismos para cooptar rutas de punto de control inmunitario. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, dicha politerapia puede usarse para potenciar una respuesta inmunitaria antivírica.

Los inhibidores de punto de control inmunitario incluyen cualquier agente que bloquee o inhiba de una manera estadística, clínica o biológicamente significativa, las rutas inhibitorias del sistema inmunitario. Dichos inhibidores pueden incluir inhibidores de molécula pequeña o pueden incluir anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a y bloquean o inhiben los receptores de punto de control inmunitario o anticuerpos que se unen a y bloquean o inhiben los ligandos del receptor de punto de control inmunitario. Las moléculas de punto de control inmunitario ilustrativas que pueden abordarse para bloqueo o inhibición incluyen, aunque sin limitación, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de moléculas de CD2 y se expresa en todos los linfocitos NK, $\gamma\delta$ y T CD8⁺ de memoria ($\alpha\beta$)), CD160 (también mencionado como BY55) y CGEN-15049. Los inhibidores de punto de control inmunitario incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, u otras proteínas de unión, que se unen a y bloquean o inhiben la actividad de uno o más de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 y CGEN-15049. Los inhibidores de punto de control inmunitario ilustrativos incluyen Tremelimumab (anticuerpo de bloqueo de CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y Yervoy/ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4).

En una realización adicional, las composiciones adyuvantes de la presente memoria se administran en combinación con una citocina. Por "citocina" se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas las hormonas de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humana N-metilada y hormona del crecimiento bobina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteínicas tales como hormona foliculoestimulante (FSH), tiotropina (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia antimulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando de kit (KL). Tal como se usa en la presente memoria, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante,

y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden adyuvantes como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con cloroquina o hidroxicloroquina, un agente lisosomotrópico que evita la acidificación endosómica y que inhibe la autofagia inducida por células tumorales para sobrevivir al crecimiento celular acelerado y la privación de nutrientes. Más en general, las composiciones que comprenden adyuvantes como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con agentes terapéuticos que actúan como inhibidores de autofagia, radiosensibilizadores o quimiosensibilizadores, tales como cloroquina, misonidazol, metronidazol y citotoxinas hipóxicas, tales como tirapazamina. A este respecto, dichas combinaciones con cloroquina u otro radio o quimiosensibilizador, o inhibidor de autofagia, pueden usarse en combinación adicional con otros agentes terapéuticos contra el cáncer o con radioterapia.

En otra realización, las composiciones que comprenden adyuvantes como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con fármacos de molécula pequeña que se sabe que provocan la destrucción de las células tumorales con activación concomitante de respuestas inmunitarias, llamada "muerte celular inmunógena" tales como ciclofosfamida, doxorubicina, oxaliplatino y mitoxantrona. Además, las combinaciones de fármacos que se sabe que potencian la inmunogenicidad de las células tumorales tales como patupilona (epotilona B), anticuerpo monoclonal dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) 7A7.27, inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo, vorinostat, romidepsina, panobinostat, belinostat, y entinostat), el ácido graso n3-poliinsaturado ácido docosahexaenoico, además inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib), shikonina (el constituyente principal de la raíz de *Lithospermum erythrorhizon*) y virus oncolíticos, tales como TVec (talimogén laherparepvec). En otras realizaciones, las composiciones que comprenden adyuvantes como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con tratamientos epigenéticos, tales como inhibidores de la ADN metiltransferasa (por ejemplo, Decitabina, 5-aza-2'-desoxicitidina) que pueden administrarse de forma local o sistémica.

En otra realización, las composiciones adyuvantes como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos que aumentan la captación de ADCC del tumor por las DC. Por tanto, la presente invención contempla combinar composiciones que comprenden GLA con cualquier molécula que induzca o potencie la ingesta de una célula tumoral o sus fragmentos por una célula presentadora de antígeno y la posterior presentación de antígenos tumorales al sistema inmunitario. Estas moléculas incluyen agentes que inducen la unión al receptor (tal como receptores de Fc o de manosa) y el transporte a la célula presentadora de antígeno tales como anticuerpos, moléculas de tipo anticuerpo, moléculas multivalentes multiespecíficas y polímeros. Dichas moléculas pueden administrarse por vía intratumoral con la composición que comprende GLA, o administrarse por una vía diferente. Por ejemplo, una composición que comprende GLA como se describe en la presente memoria puede administrarse por vía intratumoral junto con inyección intratumoral de rituximab, cetuximab, trastuzumab, Campath, panitumumab, ofatumumab, brentuximab, pertuzumab, Ado-trastuzumab emtansina, Obinutuzumab, anticuerpos anti-HER1, -HER2, o -HER3 (por ejemplo, MEHD7945A; MM-111; MM-151; MM-121; AMG888), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, Nimotuzumab, ABT-806) u otros anticuerpos similares. Cualquier estructura multivalente que pueda acoplar receptores de Fc y otros receptores que puedan inducir la internalización puede usarse en las politerapias descritas en la presente memoria, por ejemplo, péptidos y/o proteínas que pueden unirse a dianas que están ligadas a fragmentos Fc o polímeros que pueden acoplar con receptores.

En determinadas realizaciones, la combinación de adyuvantes con dichos anticuerpos puede combinarse además con un anticuerpo que promueve una señal coestimuladora (por ejemplo, bloqueando rutas inhibidoras), tal como anti-CTLA-4, o que activa rutas coestimuladoras tal como un anticuerpo anti-CD40, anti-CD28, anti-ICOS, anti-OX40, anti-CD27 y similares.

Las composiciones que comprenden adyuvantes pueden administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos conocidos contra el cáncer, tales como radioterapia, inhibidores de punto de control inmunitario, quimioterapia u otros agentes terapéuticos contra el cáncer, trasplante, inmunoterapia, hormonoterapia, tratamiento fotodinámico, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con anticuerpos.

En las realizaciones de combinación descritas en la presente memoria, el agente terapéutico que se usa en combinación con los adyuvantes descritos en la presente memoria puede administrarse como una composición separada o puede administrarse en la misma composición que los adyuvantes descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, las politerapias se administran simultáneamente en el mismo sitio, pero pueden administrarse en un momento diferente (antes o después de la composición adyuvante) y, en determinados casos, en un sitio diferente.

Una composición que comprende el inmunógeno o una composición que comprende un vector de expresión recombinante que codifica el inmunógeno o una partícula de vector que comprende el vector se empaquetan y aportan en viales diferentes a los que contienen el adyuvante. Típicamente se envasan fichas técnicas apropiadas con cada composición que indica la aplicación terapéutica pretendida. La elección de un adyuvante y/o el excipiente depende de la estabilidad del inmunógeno, el vector de expresión recombinante y/o la partícula de vector; la vía de administración; la pauta posológica; y la eficacia del adyuvante para la especie que está vacunando. Para administración en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que sea aprobado o es

aprobable para administración a seres humanos por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, como se analiza en la presente memoria y se sabe en la técnica, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para administración a seres humanos.

5 Los adyuvantes útiles para su uso en los métodos descritos en la presente memoria son adyuvantes fisiológica o farmacéuticamente adecuados para el sujeto al que se administra el adyuvante. Las composiciones adyuvantes comprenden al menos un adyuvante (es decir, uno o más adyuvantes) y, opcionalmente, al menos un excipiente fisiológica o farmacéuticamente adecuado (o aceptable). Puede emplearse cualquier excipiente o vehículo fisiológico o farmacéuticamente aceptable (es decir, un material atóxico que no interfiere con la actividad del principio activo) conocido por los expertos en la materia para su uso en composiciones farmacéuticas, en las composiciones adyuvantes descritas en la presente memoria. Los excipientes ejemplares incluyen diluyentes y vehículos que mantienen la estabilidad e integridad del componente o componentes del adyuvante. Los excipientes para uso terapéutico son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 21.^a Ed. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)) y se describen en mayor detalle en la presente memoria.

Inmunógenos y composiciones inmunógenas

15 Un inmunógeno que puede usarse en estos métodos incluye cualquier inmunógeno para el que se desea inducción de una respuesta inmunitaria específica. El inmunógeno puede inducir una respuesta humoral (es decir, una respuesta de linfocitos B) o una respuesta mediada por células (incluyendo una respuesta de linfocitos T citotóxicos) o ambas. En particular, un inmunógeno contemplado para su uso en los métodos de la presente memoria comprende uno o más antígenos víricos oncógenos. En determinadas realizaciones, el inmunógeno comprende uno o más antígenos víricos oncógenos y uno o más antígenos asociados a tumor. En determinadas realizaciones, se usa uno o más antígenos víricos oncógenos como inmunógeno para las inmunizaciones de sensibilización y atracción. En otra realización, uno o más antígenos víricos oncógenos es el inmunógeno en la sensibilización y uno o más antígenos asociados a tumor es el inmunógeno para la atracción administrado de forma local. En determinadas realizaciones, se usa uno o más antígenos víricos oncógenos y uno o más antígenos asociados a tumor como inmunógeno en la sensibilización y uno o más antígenos víricos oncógenos y uno o más antígenos asociados a tumor se usan como inmunógeno administrado de forma local para la atracción. En realizaciones particulares, la composición adyuvante (la composición "de atracción") no comprende o está sustancialmente desprovista de inmunógeno.

30 Una respuesta inmunitaria mediada por células incluye una respuesta de linfocitos T auxiliares (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T CD4) o una respuesta de linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, una respuesta de linfocitos T CD8) o ambas, que es una respuesta que puede destruir o dañar una célula (por ejemplo, una célula tumoral, célula bacteriana, virus, parásito o célula fúngica) o partícula infecciosa (por ejemplo, una partícula vírica) que produce o expresa el inmunógeno. Cualquier antígeno de un virus oncógeno que esté asociado con inducción de cáncer para el que una respuesta humoral o respuesta inmunitaria mediada por células o ambas es beneficiosa para el sujeto inmunizado puede usarse como inmunógeno. Los antígenos víricos oncógenos son conocidos en la técnica. Un antígeno puede ser un antígeno identificado previamente de un virus oncógeno, o puede identificarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un antígeno de un virus oncógeno asociado con un tipo de cáncer del que un paciente puede padecer puede ser conocido, o puede identificarse a partir del virus oncógeno o del propio tumor por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Uno o más de dichos antígenos víricos oncógenos puede usarse para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres inducidos por virus como se describe en la presente memoria. Los virus oncógenos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV, y KSHV. Los antígenos víricos ejemplares de virus oncógenos que pueden usarse en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, EBV: EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; HPV: E6, E7, E5; HBV: HBx; HCV: Core, NS3, Ns5A; HTLV: Tax, HBZ; KSHV: vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1. En realizaciones particulares, estos inmunógenos pueden suministrarse a células presentadoras de antígeno, particularmente células dendríticas, usando las partículas de vector descritas en la presente memoria que comprenden un vector de expresión recombinante.

50 En determinadas realizaciones, el inmunógeno comprende un antígeno de un virus oncógeno y un antígeno asociado a tumor. Los antígenos asociados con cánceres, tal como cáncer de vejiga o carcinoma de células de Merkel u otros cánceres inducidos por virus como se describe en la presente memoria, son bien conocidos en la técnica. Dicho antígeno puede saberse previamente que está asociado con el cáncer, o puede identificarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un antígeno asociado con un tipo de cáncer del que está padeciendo un paciente puede ser conocido, tal como un antígeno asociado a tumor, o puede identificarse del propio tumor por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, el inmunógeno es un antígeno asociado a tumor (también llamado en la presente memoria un antígeno tumoral) derivado de una célula cancerosa (es decir, célula tumoral) y uno o más de dichos antígenos tumorales puede ser útil para el tratamiento inmunoterapéutico de cáncer inducido por virus.

60 Los antígenos tumorales que pueden ser útiles como inmunógenos como se describe en la presente memoria y, por lo tanto, útiles para tratar cualquier cáncer, incluyendo cáncer de vejiga u otros cánceres urogenitales incluyen antígenos tumorales derivados de cánceres que se caracterizan por expresión de antígeno asociado a tumor, tal como expresión de HER-2/neu. Los antígenos asociados a tumor que pueden usarse como inmunógenos incluyen antígenos tumorales específicos de linaje tales como los antígenos de linaje de melanocito-melanoma

MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinasa y proteína relacionada con tirosinasa. Los antígenos asociados a tumor ilustrativos incluyen, aunque sin limitación, antígenos tumorales derivados de o que comprenden uno cualquier o más de NY-ESO-1, LAGE-1, CT7, CT10, MAGE 1, 3 y MAGE 4 (u otros antígenos MAGE tales los divulgados en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (también conocido como NY ESO 1); SAGE; y HAGE (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/53061) o GAGE, p53, Ras, c-Myc, serina/treonina cinasas citoplásmicas (por ejemplo, A-Raf, B-Raf, y C-Raf, cinasas dependientes de ciclina), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, MPHOSPH1 (fosfoproteína 1 de fase M), DEPDC1 (proteína que contiene dominio DEP 1), decorina, proteínas oncofetales IMP3, el antígeno T de poliomavirus BK, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbc-abl, BCR-ABL, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , transductor 1 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, tirosina cinasas receptoras (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (en particular, EGFRvIII), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGFR)), tirosina cinasas citoplásmicas (por ejemplo, la familia src, la familia syk-ZAP70), cinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6, factores inducibles por hipoxia (por ejemplo, HIF-1 α y HIF-2 α), factor nuclear Kappa B (NF- κ B), receptores de Notch (por ejemplo, Notch1-4), c-Met, dianas de mamífero de rapamicina (mTOR), WNT, cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), y sus subunidades reguladoras, PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, carcinoma de células renales -5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX) (también conocida como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de corte de traslocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión de ETS de TMPRSS2), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, poli(ácido siálico), MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoBoH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumaína, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con fos e idiopio.

Los antígenos de cáncer de vejiga derivados de tumor o de célula tumoral ejemplares incluyen antígenos testiculares cancerosos (CTA), NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, y GAGE. MAGE 1, 3, y MAGE 4 (u otros antígenos MAGE tales como los divulgados en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (también conocido como NY ESO 1); SAGE; y HAGE (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/53061) o GAGE (Robbins *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 8:628-36 (1996); Van den Eynde *et al.*, *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27:81-86 (1997); Van den Eynde *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 9:648-93 (1997); Correale *et al.* *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 293 (1997)). Además, las oncoproteínas identificadas recientemente MPHOSPH1 (fosfoproteína 1 de fase M) y DEPDC1 (proteína que contiene dominio DEP 1), que se expresan altamente en cánceres de vejiga y pueden inducir respuestas CTL en pacientes (Obara, W., *et al.*, *Jpn J Clin Oncol.* julio de 2012; 42(7):591-600), y decorina, que se ha implicado en la capacidad de invasión de las células cancerosas de vejiga (El Behi, M., *et al.*, *EMBO Mol Med.* Diciembre de 2013; 5(12):1835-51). Además, las proteínas oncofetales IMP3 y MAGE-A (Xylinas, E., *et al.*, *J Urol.* 28 de agosto de 2013. pii: S0022-5347(13)05275-0.) y el antígeno T de poliomavirus BK (Alexiev, B.A., *et al.*, *Hum Pathol.* Mayo de 2013; 44(5):908-17).

Los inmunógenos también incluyen antígenos tumorales que comprenden regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de genes mutados en células tumorales o de genes transcritos a diferentes niveles en células tumorales en comparación con células normales, tal como enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reordenamiento de bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o de tipo silvestre, citocromo P450 1B1 y secuencias sinérgicas expresadas de forma anómala tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenamientos clonales de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en mieloma y linfomas de linfocitos B; antígenos tumorales que comprenden regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de procesos oncovíricos, tales como proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano; proteína LMP2 del virus de Epstein bar; proteínas oncofetales no mutadas con una expresión selectiva de tumor, tal como antígeno carcinoembrionario y alfa-fetoproteína. Véase también, Boon *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12:337-65 (1994); Renkvist *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 50:3-15 (2001).

Los inmunógenos también incluyen antígenos de virus oncógeno que comprenden o consisten en al menos un fragmento inmunógeno de una proteína vírica oncógena.

Pueden usarse polipéptidos que comprenden al menos un fragmento inmunógeno de un polipéptido inmunógeno como inmunógenos a administrarse con los adyuvantes como se describe en la presente memoria y/o codificados por los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria. Un fragmento inmunógeno comprende al menos un epítipo de linfocitos T o al menos un epítipo de linfocitos B. El fragmento inmunógeno puede consistir en al menos 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos contiguos de un polipéptido inmunógeno. Los fragmentos inmunógenos pueden comprender un número suficiente de aminoácidos contiguos que forman un epítipo lineal o pueden comprender un número suficiente de aminoácidos contiguos que permitan que el fragmento se pliegue en la misma conformación tridimensional (o suficientemente similar) que el polipéptido de longitud completa del que se obtiene el fragmento y presenta un epítipo o epítipos no lineales

(también mencionados en la técnica como epítomos conformacionales). La conformación tridimensional de un fragmento polipeptídico es suficientemente similar al polipéptido de longitud completa cuando la capacidad de unión y el nivel de unión de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de longitud completa es sustancialmente igual para el fragmento que para el polipéptido de longitud completa.

- 5 Los ensayos para evaluar si el fragmento inmunógeno se pliega en una conformación comparable con el polipéptido de longitud completa incluyen, por ejemplo, la capacidad de la proteína de reaccionar con anticuerpos mono- o policlonales que son específicos para epítomos nativos o no plegados, la retención de otras fracciones de unión a ligando y la sensibilidad o resistencia del fragmento polipeptídico a la digestión con proteasas. (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001)).
- 10 Métodos adicionales para identificar regiones epitópicas incluyen métodos descritos en Hoffmeister *et al.*, *Methods* 29:270-281 (2003); Maecker *et al.*, *J. Immunol. Methods* 255:27-40 (2001). Se describen ensayos para identificar epítomos en la presente memoria y se conocen para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, los descritos en *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (Ed.), John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1991).

15 La identificación de una región inmunógena y/o epítomo de inmunógeno de interés puede determinarse fácilmente de forma empírica por un experto en la materia o por análisis informático y modelado informático, y usando métodos y técnicas que se ponen en práctica de forma rutinaria por expertos en la materia. Los métodos empíricos incluyen, a modo de ejemplo, la síntesis de fragmentos polipeptídicos que comprenden una longitud particular de aminoácidos contiguos de una proteína, o la generación de fragmentos mediante el uso de una o más proteasas y después la determinación de la inmunogenicidad de los fragmentos usando uno cualquiera de números ensayos de unión o

20 métodos de inmunoensayo puestos en prácticas de forma rutinaria en la técnica. Los métodos ejemplares para determinar la capacidad de un anticuerpo (policlonal, monoclonal o fragmento de unión antígeno del mismo) de unirse específicamente a un fragmento incluyen, aunque sin limitación, ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, ensayos de unión competitiva, análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y resonancia de plasmones superficiales.

25 La determinación de las estructuras tridimensionales de un polipéptido, o fragmento inmunógeno del mismo, de interés puede realizarse por metodologías rutinarias para determinar si el fragmento inmunógeno retiene la colocación espacial de los aminoácidos encontrados en el polipéptido de longitud completa. Véase, por ejemplo, Bradley *et al.*, *Science* 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman *et al.*, *Science* 310:638 (2005); Dietz *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:1244 (2006); Dodson *et al.*, *Nature* 450:176 (2007); Qian *et al.*, *Nature* 450:259 (2007).

30 También están disponibles en la técnica herramientas informáticas, por ejemplo, PSORT o PSORT II, y Spscan (Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group) que son útiles para predecir los segmentos transmembranarios y la topología de membrana de los polipéptidos que se sabe o se cree que atraviesa la membrana celular (véase, por ejemplo, Nakai *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 24:34-36 (1999)).

35 Por separado, o en combinación con las técnicas descritas anteriormente, y dada una secuencia de aminoácidos ejemplar de un polipéptido de interés, un experto en la materia puede identificar epítomos potenciales del polipéptido (véase, por ejemplo, Jameson y Wolf, *Comput. Appl. Biosci.* 4:181-86 (1988)). A modo de otro ejemplo, Hopp y Woods describen el método de hidrofilia, que se basa en demostraciones empíricas de la correlación cercana entre la hidrofilia de las regiones polipeptídicas y su antigenicidad (véase, por ejemplo, Hopp, *Pept. Res.* 6:183-90 (1993); Hofmann *et al.*, *Biomed. Biochim. Acta* 46:855-66 (1987)). También hay programas informáticos disponibles para

40 identificar epítomos de linfocitos B o linfocitos T. Un programa BASIC llamado EPIPLOT predice sitios antigénicos de linfocitos B en proteínas a partir de sus estructuras primarias calculando y representando los perfiles de flexibilidad, hidrofilia y antigenicidad usando 13 escalas diferentes (véase, por ejemplo, Menendez *et al.*, *Comput. Appl. Biosci.* 6:101-105 (1990)). Véase también, tal como Van Regenmortel, *Methods: a companion to Methods in Enzymology*, 9:465-472 (1996); Pellequer *et al.*, "Epitope predictions from the primary structure of proteins," en *Peptide antigens: a practical approach* (ed. G.B. Wisdom), pág. 7-25; Oxford University Press, Oxford (1994); Van Regenmortel, "Molecular dissection of protein antigens" en *Structure of antigens* (ed. M.H.V. Van Regenmortel), Vol. 1, pág. 1-27. CRC Press, Boca Raton (1992).

45 Los epítomos de linfocitos T de un inmunógeno también pueden identificarse usando un programa de búsqueda de motivos peptídicos basado en algoritmos desarrollados por Rammensee, *et al.* (*Immunogenetics* 50: 213-219 (1999)); por Parker, *et al.* (*supra*) o mediante el uso de métodos tales como los descritos por Doytchinova y Flower en *Immunol. Cell Biol.* 80(3):270-9 (2002); Blythe *et al.*, *Bioinformatics* 18:434-439 (2002); Guan *et al.*, *Applied Bioinformatics* 2:63-66 (2003); Flower *et al.*, *Applied Bioinformatics* 1:167-176 (2002); Mallios, *Bioinformatics* 17: 942-48 (2001); Schirle *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 257:1-16 (2001). Los epítomos de linfocitos T también pueden identificarse usando ensayos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo, usando combinaciones de péptidos

55 solapantes para estimular linfocitos T *in vitro* y midiendo la proliferación celular (ensayos de proliferación) y/o destrucción citotóxica (ensayos de CTL).

También se describen en la técnica regiones epitópicas de antígenos de virus tumorales u oncógenos que pueden usarse como inmunógenos en los métodos descritos en la presente memoria. Véase, a modo de ejemplo, Lamb *et al.*, *Rev. Infect. Dis.* marzo - abril: Supl. 2: s443 - 447 (1989); Lamb *et al.*, *EMBO J.* 6:1245-49 (1987); Lamb *et al.*, *Lepr. Rev. Supl.* 2:131-137 (1986); Mehra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7013 -27 (1986); Horsfall *et al.*, *Immunol. Today* 12:211-13 (1991); Rothbard *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 155:143-52 (1990); Singh *et al.*,

Bioinformatics 17:1236-37 (2001); DeGroot *et al.*, Vaccine 19:4385-95 (2001); DeLalla *et al.*, J. Immunol. 163:1725-29 (1999); Cochlovius *et al.*, J. Immunol. 165:4731-41 (2000); Consogno *et al.*, Blood 101:1039-44 (2003); Roberts *et al.*, AIDS Res. Hum. Retrovir. 12:593-610 (1996); Kwok *et al.*, Trends Immunol. 22:583-88 (2001); Novak *et al.*, J. Immunol. 166:6665-70 (2001).

5 En determinados casos cuando están disponibles líneas o clones de linfocitos T específicos de antígeno, por ejemplo, linfocitos de infiltración tumoral (TIL), linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de virus o específicos de bacteria, estas células pueden usarse para cribar la presencia de epítomos relevantes usando células diana preparadas con antígenos específicos. Dichas dianas pueden prepararse usando colecciones de péptidos sintéticos aleatorias o seleccionadas, que se usarían para sensibilizar las células diana para la lisis por los CTL. Otra estrategia para identificar un epítomo relevante cuando están disponibles líneas o clones de linfocito T es usar metodologías de ADN recombinante. En primer lugar, se preparan colecciones génicas o ADNc de dianas susceptibles a CTL y se transfectan en células dianas no susceptibles. Esto permite la identificación y clonación del gen que codifica el precursor proteínico del péptido que contiene el epítomo CTL. La segunda etapa en este proceso es preparar genes truncados a partir del gen clonado relevante, para estrechar la región que codifica el al menos un epítomo CTL. Esta etapa es opcional si el gen no es demasiado grande. La tercera etapa es preparar péptidos sintéticos de, por ejemplo, aproximadamente 10-20 aminoácidos de longitud, que solapan en 5-10 restos, que se usan para sensibilizar dianas para los CTL. Cuando se muestra que un péptido o péptidos contienen el epítomo relevante y, si se desea, pueden prepararse péptidos más pequeños para establecer el péptido de tamaño mínimo que contenga el epítomo. Estos epítomos típicamente están contenidos, pero no necesariamente, en 9-10 restos para epítomos CTL y hasta 20 o 30 restos para epítomos de linfocitos T auxiliares (HTL).

Como alternativa, los epítomos pueden definirse por elución directa de péptidos que no se unen covalentemente por moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) particular seguido de secuenciación de aminoácidos de los péptidos eluidos (véase, por ejemplo, Engelhard *et al.*, Cancer J. mayo de 2000; 6 Supl. 3: S272-80). En resumen, los péptidos eluidos se separan usando un método de purificación tal como HPLC, y las fracciones individuales se ensayan para su capacidad de sensibilizar dianas para la lisis por CTL o de inducir la proliferación de secreción de citocinas en HTL. Cuando se ha identificado una fracción que contiene el péptido, se purifica adicionalmente y somete a análisis de secuencia. La secuencia peptídica también puede determinarse usando espectrometría de bases en tándem. Entonces se prepara un péptido sintético y se ensaya con los CTL o HTL para corroborar que se ha identificado la secuencia y péptido correctos.

30 Los epítomos también pueden identificarse usando análisis informático, tal como el programa Tsites (véase, por ejemplo, Rothbard y Taylor, EMBO J. 7:93-100, 1988; Deavin *et al.*, Mol. Immunol. 33:145-155, 1996), que busca motivos peptídicos que tienen el potencial de provocar respuestas Th. Los péptidos CTL con motivos apropiados para la unión a MHC de clase I o clase II murino o humano pueden identificarse de acuerdo con BIMAS (Parker *et al.*, J. Immunol. 152:163, 1994) u otros análisis de predicción de unión de péptidos HLA. En resumen, las secuencias proteínicas, por ejemplo, de componentes o antígenos microbianos, o componentes de células tumorales o antígenos tumorales, se examinan para la presencia de motivos de unión a MHC. Estos motivos de unión, que existen para cada alelo de MHC, son restos de aminoácido conservados, habitualmente en las posiciones 2 (o 3) y 9 (o 10) para péptidos de unión a MHC de clase I que son típicamente de 9-10 restos de longitud. Entonces se preparan péptidos sintéticos que comprenden aquellas secuencias que albergan los motivos de unión a MHC, y posteriormente dichos péptidos se ensayan para su capacidad de unirse a moléculas MHC. El ensayo de unión a MHC puede realizarse usando células que expresan altos números de moléculas MHC vacías (no ocupadas) (ensayo de unión celular) o usando moléculas MHC purificadas. Finalmente, los péptidos de unión a MHC entonces se ensayan para su capacidad de inducir una respuesta CTL en individuos no tratados previamente, *in vitro* usando linfocitos humanos o *in vivo* usando animales transgénicos para HLA. Estos CTL se ensayan usando células diana sensibilizadas con péptido y dianas que procesan de forma natural el antígeno, tales como células infectadas con virus o células tumorales. Para confirmar adicionalmente la inmunogenicidad, puede ensayarse un péptido usando un modelo de ratón transgénico para HLA A2 y/o cualquiera de una diversidad de ensayos de estimulación *in vitro*.

En determinadas realizaciones, un inmunógeno (es decir, un antígeno de virus oncógeno o un antígeno asociado a tumor) incluye una especie de polipéptido que tiene una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos que es conocida y está disponible en la técnica para el inmunógeno respectivo. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son bien conocidas y pueden producirse de forma natural en el polipéptido o pueden introducirse cuando el polipéptido se produce de forma recombinante. Pueden introducirse sustituciones, eliminaciones y adiciones de aminoácido en un polipéptido usando métodos bien conocidos y puestos en práctica de forma rutinaria de mutagénesis (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2001)). Pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótido (o específica de segmento) para proporcionar un polinucleótido alterado que tenga codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, eliminación o inserción deseada. También pueden construirse variantes de eliminación o truncamiento de inmunógenos usando sitios de endonucleasa de restricción convenientes adyacentes a la eliminación deseada. Posterior a la restricción, pueden rellenarse los salientes y religarse el ADN. Como alternativa, pueden usarse técnicas de mutagénesis aleatoria, tal como mutagénesis con barrido de alanina, mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores y mutagénesis dirigida por oligonucleótido para preparar variantes polipeptídicas inmunógenas (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). Las variantes de un inmunógeno particular

(o fragmento polipeptídico del mismo) incluyen un inmunógeno polipeptídico que tiene al menos un 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos ejemplares conocidas en la técnica.

5 Estas variantes inmunógenas polipeptídicas retienen, de una manera estadística, clínica o biológicamente significativa, la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta humoral (es decir, respuesta de linfocitos B), respuesta mediada por células (es decir, respuesta de linfocitos T (incluyendo una respuesta de linfocitos T citotóxicos)) o tanto una respuesta humoral como mediada por células en un sujeto. Dadas las muchas técnicas y métodos de biología molecular, expresión de proteínas y aislamiento de proteínas puestos en práctica de forma rutinaria en la técnica para introducir mutaciones en un polipéptido, preparar fragmentos polipeptídicos, aislar los fragmentos y variantes y analizar los mismos, pueden prepararse variantes polipeptídicas inmunógenas y fragmentos que tengan la capacidad deseada de inducir una respuesta inmunitaria fácilmente y sin experimentación excesiva.

15 Una diversidad de criterios conocidos para los expertos en la materia, indican si un aminoácido que está sustituido en una posición particular en un péptido o polipéptido es conservativo (o similar). Por ejemplo, una sustitución de aminoácido similar o de aminoácido conservativo es una en que un resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Los aminoácidos similares pueden incluirse en las siguientes categorías: aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); aminoácidos con cadenas laterales ácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, histidina); aminoácidos con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); aminoácidos con cadenas laterales de ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). La prolina, que se considera más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (por ejemplo, leucina, valina, isoleucina y alanina). En determinadas circunstancias, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o asparagina por ácido aspártico puede considerarse una sustitución similar ya que la glutamina y la asparagina son derivado amida del ácido glutámico y el ácido aspártico, respectivamente. Como se entiende en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustitutos de aminoácido conservados a la misma del polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido (por ejemplo, usando GENEWORKS, Align, el algoritmo BLAST u otros algoritmos descritos en la presente memoria y puestos en práctica en la técnica.

25 Como se describe en la presente memoria para fragmentos inmunógenos, los ensayos para evaluar si una variante respectiva se pliega en una conformación comparable con el polipéptido no variante o fragmento incluyen, por ejemplo, la capacidad de la proteína de reaccionar con anticuerpos mono- o policlonales que son específicos para epítopos nativos o no plegados, la retención de las funciones de unión a ligando y la sensibilidad o resistencia de la proteína mutante a digestión con proteasas (véase, Sambrook *et al.*, *supra*). Dichas variantes pueden identificarse, caracterizarse y/o prepararse de acuerdo con métodos descritos en la presente memoria u otros métodos conocidos en la técnica, que se ponen en práctica de forma rutinaria por los expertos en la materia.

35 Las composiciones inmunógenas que se administran a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir a al menos un excipiente farmacéuticamente (o fisiológicamente) adecuado. Cualquier excipiente o vehículo fisiológico o farmacéuticamente adecuado (es decir, un material atóxico que no interfiere con la actividad del principio activo) conocido por los expertos en la materia para su uso en composiciones farmacéuticas puede emplearse en las composiciones inmunógenas descritas en la presente memoria. Los excipientes ejemplares incluyen diluyentes y vehículos que mantienen la estabilidad e integridad de las proteínas. Los excipientes para uso terapéutico son bien conocidos, y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 21.^a Ed. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)), y se describen en mayor detalle en la presente memoria.

Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer

40 Cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede usarse en un método de tratamiento de un sujeto humano o animal. El método puede comprender la administración de las composiciones al sujeto como se describe en la presente memoria.

55 En una realización, se proporcionan métodos en la presente memoria para tratar el cáncer induciendo una respuesta inmunitaria específica para un antígeno asociado a cáncer opcionalmente en combinación con uno o más antígenos diferentes. En particular, los métodos proporcionados en la presente memoria comprenden inducir una respuesta inmunitaria específica para un inmunógeno administrando a un sujeto que lo necesita una composición que comprende una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante, que es un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica el inmunógeno (también llamado en la presente memoria una primera composición o una composición inmunógena), en los que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora. De forma simultánea o secuencial, se administra al sujeto una segunda composición que comprende una adyuvante farmacéuticamente adecuado (también llamado en la presente memoria una composición adyuvante) sustancialmente desprovista de un antígeno.

5 En determinadas realizaciones, la segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado también puede comprender un inmunógeno. En general, la primera composición de "sensibilización" se administra de forma sistémica (por ejemplo, mediante inyección intradérmica, intramuscular o subcutánea) y la segunda composición (por ejemplo, una composición adyuvante) se administra de forma local, tal como por vía intratumoral, peritumoral, intranodal, perinodal, a la mucosa o intravesical.

10 En una realización, se proporcionan métodos en la presente memoria para tratar cáncer inducido por virus induciendo una respuesta inmunitaria específica para un antígeno de virus oncógeno opcionalmente en combinación con un antígeno asociado a tumor donde el cáncer está asociado con el virus oncógeno. En particular, los métodos proporcionados en la presente memoria comprenden la inducción de una respuesta inmunitaria específica para un
 15 inmunógeno administrando a un sujeto que lo necesita una composición que comprende una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante, que es un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica el inmunógeno (también llamado en la presente memoria una primera composición o una composición inmunógena), en los que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora. De forma simultánea o secuencial, se administra al sujeto una segunda composición que
 20 comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado (también llamado en la presente memoria una composición adyuvante). En determinadas realizaciones, la segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado también puede comprender un inmunógeno. En determinadas realizaciones, la primera composición comprende un antígeno de virus oncógeno y se administra de forma sistémica (por ejemplo, mediante inyección intradérmica, intramuscular o subcutánea). La segunda composición (por ejemplo, una
 25 composición adyuvante), en determinadas realizaciones, se administra de forma local, tal como por vía intratumoral o intravesical, y opcionalmente puede comprender el antígeno o antígenos de virus oncógeno administrados en la primera composición y/o un antígeno asociado a tumor como se describe en la presente memoria.

30 En una realización, se proporcionan métodos en la presente memoria para tratar cáncer de vejiga induciendo una respuesta inmunitaria específica para un inmunógeno administrando a un sujeto que lo necesita una composición que comprende una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante, que es un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica el inmunógeno (también llamado en la presente memoria una primera composición o una composición inmunógena), en los que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora. De forma simultánea o secuencial, se
 35 administra al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado (también llamado en la presente memoria una composición adyuvante).

40 En los métodos descritos en la presente memoria, la composición adyuvante puede incluir o no BCG, de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación. La composición adyuvante puede administrarse de una vez y de una manera suficiente para que el adyuvante potencie la respuesta inmunitaria al inmunógeno; es decir, el nivel de la respuesta inmunitaria específica para el inmunógeno (es decir, respuesta humoral, respuesta mediada por
 45 células o tanto respuesta humoral como respuesta mediada por células) es mayor (o aumentado) de una manera estadística, clínica y/o biológicamente significativa en comparación con el nivel de la respuesta inmunitaria específica para el inmunógeno cuando el inmunógeno se administra en ausencia del adyuvante. En aquellos casos cuando el antígeno no puede inducir una respuesta inmunitaria específica detectable en ausencia de un adyuvante, la inducción de una respuesta inmunitaria específica detectable representa la potenciación de la respuesta
 50 inmunitaria. En otras realizaciones, la composición adyuvante se administra de una vez y de una manera suficiente para que el adyuvante reclute linfocitos T (por ejemplo, los linfocitos T CD8 inducidos después de administración de la primera composición inmunógena) al sitio de administración local (por ejemplo, el tumor o la mucosa de la vejiga).

55 De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, la primera composición inmunógena actúa como composición de "sensibilización" u opcionalmente una composición de "sensibilización/refuerzo" (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 2012/141984 que describe pautas de sensibilización/refuerzo, útiles en la presente memoria). La primera composición inmunógena comprende una partícula de vector y/o un vector de expresión recombinante y, opcionalmente un adyuvante tal como un agonista de TLR descrito en la presente memoria. Como se describe en la presente memoria, la partícula de vector/vector de expresión y opcionalmente un adyuvante pueden estar en la misma o en diferentes composiciones, y pueden administrarse en el mismo sitio, tiempo y vía o
 60 diferentes. En determinadas realizaciones, la segunda composición, o composición adyuvante, comprende un adyuvante y, opcionalmente, BCG. El adyuvante y BCG, de acuerdo con diversas realizaciones, pueden estar en la misma o en diferentes composiciones, y pueden administrarse en el mismo sitio, tiempo y vía o diferentes. En determinadas realizaciones, la segunda composición, o composición adyuvante, comprende un adyuvante y, opcionalmente, BCG y/o un antígeno asociado a tumor, por ejemplo, un antígeno asociado con cáncer de vejiga.

65 Inducir una respuesta inmunitaria usando los métodos de inmunización de sensibilización-atracción y las composiciones inmunógenas descritas en la presente memoria puede conseguirse empleando una diversidad de diferentes pautas. Una lista no exhaustiva ejemplar de pautas de inmunización comprende administrar:

a) una primera composición que comprende un vector de expresión que codifica y expresa un inmunógeno; y/o

60 b) una primera composición que comprende un vector de expresión que codifica y expresa un inmunógeno y también que comprende un adyuvante;

c) una primera composición que comprende linfocitos T específicos de antígeno tumoral autólogos o heterólogos que se han expandido *ex vivo*, modificado genéticamente con un receptor de antígeno quimérico para que reconozca un antígeno asociado a tumor (linfocitos CAR-T) o linfocitos T modificados genéticamente para que expresen un receptor de linfocitos T quimérico específico (linfocitos CAR-TCR) que reconoce un epítipo asociado a cáncer en el contexto de MHC;

en la que a) o b) o c) se administra múltiples veces, en cualquier orden (con respecto unos a otros) y pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente y en diferentes sitios y vías de administración o las mismas que las siguientes segundas composiciones:

i) una composición que comprende un adyuvante sin un inmunógeno;

ii) una composición que comprende un adyuvante con BCG;

iii) una composición que comprende un adyuvante con un inmunógeno; y/o

iv) una composición que comprende un adyuvante con un inmunógeno y BCG.

Aunque se describen pautas ejemplares descritas en la presente memoria como pautas de "sensibilización-atracción", se apreciará que las composiciones proporcionadas anteriormente pueden administrarse múltiples veces, en cualquier orden, o pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente y en diferentes sitios y vías de administración o las mismas. Como ejemplo no limitante, la presente divulgación contempla una administración de "sensibilización" con composición a) o b) o c) anteriores, opcionalmente, una o más administraciones de "refuerzo" con composición a) o b) o c) anteriores, y una administración de "atracción" con composición i) - iv), anteriores. Las administraciones/composiciones de sensibilización, refuerzo y atracción pueden administrarse múltiples veces, en cualquier orden, y pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o en diferentes sitios y vías de administración o las mismas. La composición de "refuerzo" en determinadas realizaciones comprende un adyuvante como se describe en la presente memoria en combinación con un inmunógeno, en realizaciones particulares, el mismo inmunógeno expresado por el vector de expresión en la primera composición (sensibilización) que codifica y expresa un inmunógeno.

En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar el adyuvante y el vector de expresión recombinante en la misma composición. En otras realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar el adyuvante y el vector de expresión recombinante en dos composiciones diferentes y en diferentes momentos, en diferentes sitios y/o mediante diferentes vías de administración. En determinadas realizaciones, la partícula de vector que comprende el vector de expresión recombinante que codifica el inmunógeno o inmunógenos de interés y el adyuvante no se combinan juntos en una única composición. En otras palabras, la composición que comprende la partícula de vector que comprende el vector de expresión recombinante que codifica un inmunógeno (es decir, composición inmunógena) carece de un adyuvante, y la composición que comprende el adyuvante carece del vector de expresión recombinante o carece de la partícula de vector que comprende el vector que codifica el inmunógeno de interés. En otras realizaciones particulares de los métodos descritos en la presente memoria, cuando se administra una composición que comprende el vector que codifica inmunógeno y una composición que comprende el adyuvante al mismo tiempo (es decir, simultáneamente), cada composición se administra en un sitio diferente. Cuando se administra cada composición en un sitio diferente, cada composición puede administrarse mediante la misma o diferentes vías. Como alternativa, cada composición puede administrarse mediante una vía diferentes al mismo tiempo. En realizaciones adicionales, el adyuvante y el vector de expresión recombinantes se administran en la misma composición.

En determinadas realizaciones, la composición de "atracción" (por ejemplo, una composición que comprende un agonista de TLR4) pueden administrarse en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sitios locales, de forma simultánea o secuencial (de forma simultánea o secuencial entre sí o de forma simultánea o secuencial con la administración de "sensibilización"; o ambas). Como ejemplo, una respuesta inmunitaria específica de antiguo generada por la administración de "sensibilización" puede "atraerse" a uno o más tumores, tal como en un sitio de tumor primario y/o uno o más sitios de tumor metastásico por administración local (por ejemplo, peritumoral o intratumoral) de una composición que comprende un adyuvante adecuado (por ejemplo, un agonista de TLR4 tal como GLA descrito en la presente memoria). Como ejemplo no limitante adicional, en determinadas realizaciones, un sitio de tumor primario puede no estar accesible para la administración de la composición de "atracción", pero puede estar accesible uno o más sitios metastásicos. En determinadas realizaciones, la administración en uno o más sitios de tumor local causa infiltración de linfocitos T específicos de antígeno al tumor donde la composición de "atracción" se administró y, en algunas realizaciones, también se observó un efecto abscópico por el que la administración en un sitio de tumor local también provoca infiltración de linfocitos T en un sitio de tumor distante y reducción en el tamaño del tumor distante.

En determinadas realizaciones, la composición de "sensibilización" inmunógena (por ejemplo, una composición que comprende un vector lentivírico que codifica un antígeno asociado a cáncer, y que incluye opcionalmente uno o más antígenos diferentes; o una composición que comprende linfocito T transferidos de forma adoptiva, linfocitos CAR-T modificados genéticamente o específicos de antígeno) y la composición adyuvante de "atracción" (por ejemplo, una

composición que comprende un agonista de TLR4) se administran simultáneamente al sujeto. Cuando las composiciones de "sensibilización" y "atracción" se administran simultáneamente, las composiciones se administran en 5 a 120 minutos entre sí. En determinadas realizaciones, la composición inmunógena (la "sensibilización") se administra en una hora de la composición adyuvante (la "atracción"). En general, la administración simultáneamente es un corto periodo de tiempo, ya que es factible para la administración segura y aceptable para el paciente y el personal clínico. En realizaciones donde la composición de sensibilización comprende linfocitos T transferidos de forma adoptiva, la administración de la composición que comprende linfocitos T puede ser durante un determinado periodo de tiempo (por ejemplo, la infusión de linfocitos T puede ser durante el transcurso de una hora, dos horas o tres horas) y la administración simultánea de la composición de atracción sigue a la totalidad de la infusión de las células, pero en general es en 5 a 120 minutos después de la infusión o como se aseguró para el paciente y se determine por el médico experto.

En realizaciones en las que las composiciones de sensibilización y atracción se administran simultáneamente, la composición inmunógena (de sensibilización) puede administrarse mediante una vía (es decir, una primera vía) y la composición adyuvante se administra mediante una segunda vía diferente. En una realización, la composición de sensibilización se administra sistémicamente (por ejemplo, por inyección intradérmica, intramuscular o subcutánea) y la composición de atracción se administra de forma local (por ejemplo, por vía intratumoral, peritumoral, intranodal, intravesical). Las vías de administración para las que pueden seleccionarse independientemente la primera y segunda vía incluyen, aunque sin limitación, administración tópica, oral, enteral, nasal (es decir, intranasal), por inhalación, intratecal, rectal, vaginal, intraocular, subconjuntival, sublingual, intradérmica, transdérmica o parenteral, incluyendo inyección o infusión subcutánea, percutánea, intravenosa, intramuscular, intratumoral, intranodal, intraesternal, intracavernosa, intravesical, intrameática o intrauretral. En determinadas realizaciones más particulares, la primera y segunda vía son diferentes y cada una se selecciona de parenteral, oral, enteral, sublingual, intranasal, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratumoral, intranodal, percutánea, transdérmica, intravesical y tópica. En una realización más específica, la primera y segunda vía son diferentes y se seleccionan de intramuscular, subcutánea, percutánea, intratumoral, intranodal, intranasal, intravesical y oral. En otra realización más, la primera composición inmunógena se administra por vía intradérmica, intramuscular o subcutánea sin adyuvante, y la composición adyuvante se administra de forma local en el sitio del cáncer, por ejemplo, por vía intratumoral o intravesical, con o sin un inmunógeno, y en determinadas realizaciones, tal como para el tratamiento de cáncer de vejiga, con o sin BCG. Las composiciones inmunógena y adyuvante se formulan apropiadamente para suministro mediante diferentes vías como se describe en la técnica y se analiza en mayor detalle en la presente memoria.

En otras realizaciones descritas en la presente memoria, cuando la composición inmunógena de "sensibilización" y la composición adyuvante se administra cada una simultáneamente al sujeto, las composiciones pueden administrarse en diferentes sitios del sujeto. Los diferentes sitios están suficientemente separados físicamente entre sí para permitir la inducción o potenciación de la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Cuando cada composición se administra a un sitio diferente, las composiciones pueden administrarse mediante la misma vía o pueden administrarse por diferentes vías. A modo de ejemplo y con fines de ilustración únicamente, la composición inmunógena puede administrarse por vía subcutánea o intramuscular a una extremidad (por ejemplo, un brazo) del sujeto y la composición adyuvante puede administrarse por vía subcutánea o intramuscular, respectivamente, a una extremidad diferente (por ejemplo, una pierna) del sujeto. A modo de ejemplo adicional, la administración de cada composición simultáneamente en diferentes sitios, pero por la misma vía puede incluir la administración de la composición inmunógena a una extremidad (por ejemplo, un brazo o una pierna) y la administración de la composición adyuvante a otra (o segunda) extremidad del mismo tipo. En otras realizaciones particulares, cuando la composición inmunógena y la composición adyuvante se administran simultáneamente en el mismo sitio, las vías de administración para cada una de las composiciones inmunógena y adyuvante son diferentes y cada una se selecciona de oral, enteral, parenteral, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratumoral, intranodal, percutánea, transdérmica, sublingual, intravesical y tópica. A modo de ejemplo, una composición puede suministrarse por vía oral para ingerirse, y la segunda composición puede suministrarse de forma sublingual. Como otro ejemplo, una composición puede suministrarse por vía intramuscular en un sitio, y la segunda composición suministrarse por vía subcutánea o percutánea en aproximadamente el mismo sitio (por ejemplo, el mismo brazo o la misma pierna).

La selección de una vía de administración dependerá de varios factores, incluyendo la composición suministrada, la edad del sujeto y la masa corporal del sujeto. La vía de administración y el sitio de administración se eligen típicamente para maximizar la cantidad de un principio activo en una composición suministrada al sujeto de la manera más segura. Los sitios típicos para administración intramuscular de una composición inmunógena y/o composición adyuvante incluyen el músculo del muslo anterolateral y el músculo deltoides. En seres humanos, la inyección intramuscular del músculo deltoides se usa típicamente por expertos en la técnica de vacunas para suministrar una vacuna a adultos, y en determinados casos a niños y adolescentes y niños pequeños entre 1 y 2 años de edad. El músculo vasto lateral en el muslo anterolateral se recomienda típicamente para inyección intramuscular de bebés (es decir, menos de un año de edad) y también puede ser el sitio de suministro intramuscular en niños mayores y adultos. Como alternativa, el sitio de una inyección intramuscular en seres humanos puede ser la zona ventroglútea. Los expertos en la materia apreciarán que puede producirse suministro subóptimo de una vacuna si la composición inmunógena se suministra a un sitio dorsoglúteo o el cuadrante exterior superior de la nalga.

A modo de ejemplo, la administración intravesical de una composición adyuvante descrita en la presente memoria incluye la administración de la composición directamente en la vejiga (por ejemplo, mediante un catéter) en lugar de administrarlo a través de la boca o inyectándolo en una vena. Las composiciones administradas de esta manera afectan principalmente a las células de revestimiento de la vejiga (mucosa). Pueden ser necesarias múltiples administraciones de la composición adyuvante ya que la permeabilidad de la capa urotelial es muy baja y las disoluciones de fármaco instiladas pueden llegar a diluirse con la orina y eliminarse de la vejiga durante el vaciado. En diversas realizaciones, pueden usarse potenciadores de la filtración, tales como quitosano y dimetilsulfóxido, para alterar temporalmente el fuerte compactamiento del urotelio y pueden usarse nanovehículos tales como liposomas, nanopartículas de gelatina, nanopartículas poliméricas y partículas magnéticas para potenciar las concentraciones locales de fármaco en la vejiga, así como células enfermas diana. En otras realizaciones, los vehículos de fármaco intravesicales se mejoran usando biomateriales mucoadhesivos que se adhieren fuertemente al revestimiento de células uroteliales, evitando de este modo que el vehículo se retire por lavado durante el vaciado de orina. Se han usado hidrogeles poliméricos, tales como polímero de PEG-PLGA-PEG sensible a la temperatura, para desarrollar sistemas gelificantes *in situ* para suministrar fármacos a la cavidad de la vejiga (GuhaSarkar, S., *et al.*, J Control Release. 1 de diciembre de 2010; 148(2):147-59).

A modo de ejemplo, sitios típicos para administración subcutánea de una composición inmunógena o adyuvante incluyen tejido graso sobre el músculo del muslo anterolateral o tejido graso sobre los tríceps. El músculo del muslo es el sitio preferido para administración subcutánea de una composición a un bebé humano. La administración percutánea puede ser en el músculo deltoides o en el músculo del muslo anterolateral.

En otra realización, la primera composición que comprende una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica al menos un inmunógeno y la segunda composición que comprende un adyuvante se administran secuencialmente. En determinadas realizaciones, la composición inmunógena se administra antes de la composición adyuvante (es decir, la composición adyuvante se administra posterior a la administración de la composición inmunógena). En otras determinadas realizaciones, la composición adyuvante se administra antes de la administración de la composición inmunógena (es decir, la composición inmunógena se administra posterior a la administración de la composición adyuvante).

En determinadas realizaciones donde la composición de "sensibilización" comprende linfocito T transferidos de forma adoptiva, la composición de sensibilización y la composición de "atracción" adecuada, tal como un agonista de TLR4 (por ejemplo, GLA) u otra composición adyuvante como se describe en la presente memoria, se administran al mismo tiempo o pueden administrarse secuencialmente. Pueden administrarse múltiples administraciones de células transferidas de forma adoptiva antes de la administración de una composición de "atracción".

Por tanto, en determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto 1) administrando al sujeto una primera composición que comprende linfocitos T específicos de antígeno asociados a tumor que se han expandido o modificado *ex vivo*, linfocitos CAR-T modificados genéticamente que se han modificado genéticamente para que reconozcan un antígeno asociado a tumor o linfocitos T modificados genéticamente para que expresen un receptor de linfocitos T (TCR) quimérico específico que reconoce un epítipo asociado a cáncer en el contexto de MHC; 2) administrando de forma local o intratumoral, de forma simultánea o posterior, al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado como se describe en la presente memoria para atraer las células transferidas de forma adoptiva al tumor; tratando de este modo el cáncer en el sujeto. En determinadas realizaciones, las células transferidas de forma adoptiva pueden reforzarse administrando al sujeto un vector de expresión como se describe en la presente memoria antes de la administración local de la segunda composición para atraer las células de forma adoptiva (y después reforzadas) al sitio local (por ejemplo, a un tumor).

En realizaciones descritas en la presente memoria donde la composición inmunógena y la composición adyuvante se administran cada una secuencialmente al sujeto que lo necesita, cada administración está separada por horas o por días. Cuando la composición adyuvante se administra secuencialmente a la composición inmunógena, la composición adyuvante se administra a un intervalo de tiempo tal que la respuesta inmunitaria reclutada al sitio de administración por la composición adyuvante es detectable. En determinadas realizaciones, la composición inmunógena se administra al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o al menos 12 horas, o las menos 18 horas antes de la administración de la composición adyuvante. En otras realizaciones particulares, la composición inmunógena se administra al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete días antes de la administración de la composición adyuvante. En otras realizaciones, la composición inmunógena se administra entre uno y 36 días antes de la administración de la composición adyuvante. La composición inmunógena puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 días antes de la administración de la composición adyuvante. En otras determinadas realizaciones más, la composición adyuvante se administra antes de la composición inmunógena y se administra al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o al menos 12 horas, o al menos 18 horas antes de la administración de la composición inmunógena. En otras realizaciones más descritas en la presente memoria, la composición adyuvante se administra antes de la composición inmunógena y se administra al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete días

antes de la administración de la composición inmunógena. En otras realizaciones, la composición adyuvante se administra entre uno y 36 días antes de la administración de la composición inmunógena. La composición adyuvante puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 días antes de la administración de la composición inmunógena. El intervalo de tiempo óptimo entre administraciones de cada composición puede determinarse por un experto en la materia diseñando apropiadamente estudios de ensayo preclínicos y clínicos. El intervalo de tiempo óptimo puede depender del inmunógeno de interés y/o el adyuvante particular administrado.

En otras realizaciones más, la composición inmunógena y la composición adyuvante se administran cada una secuencialmente al sujeto que lo necesita, más de una vez (por ejemplo, dos veces, tres veces o cuatro veces). En una realización específica, la composición adyuvante puede administrarse el mismo número de veces que la composición inmunógena. En otra realización más, la composición adyuvante puede administrarse un número menor de veces que la composición inmunógena. A modo de ejemplo no limitante, cuando la composición inmunógena se administra más de una vez, la composición adyuvante puede administrarse únicamente antes o después de la administración de la primera administración de la composición inmunógena y no antes o posterior a cualquier administración posterior (es decir, segunda, tercera o cuarta) de la composición inmunógena. En otra realización específica más, la composición adyuvante puede administrarse más veces que lo que se administra la composición inmunógena.

En otras realizaciones, la composición adyuvante puede administrarse al menos una vez más que la composición inmunógena. Por ejemplo, el adyuvante puede inducir una respuesta inmunitaria innata (o no específica) y puede administrarse a un intervalo de tiempo suficiente antes de o después de la administración de la composición inmunógena para inducir o estimular una respuesta inmunitaria innata. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, esta respuesta incluye inducción de local de citocinas y quimiocinas que reclutan linfocitos T específicos de antígeno al sitio de administración. La composición adyuvante entonces puede administrarse simultáneamente (cuya administración simultánea puede ser en un sitio diferente o mediante una vía diferente) o secuencialmente con la primera administración de la composición inmunógena.

Cuando la composición adyuvante y la composición inmunógena se administran secuencialmente, cada una de las composiciones puede administrarse mediante la misma vía o puede administrarse por diferentes vías. Las vías de administración para suministro de cada una de las composiciones adyuvantes e inmunógenas pueden seleccionarse independientemente, incluyendo, aunque sin limitación, administración tópica, oral, enteral, nasal (es decir, intranasal), por inhalación, intratecal, rectal, vaginal, intraocular, subconjuntival, sublingual, intradérmica, intratumoral, peritumoral, intranodal, perinodal, transdérmica o parenteral, incluyendo inyección o infusión subcutánea, percutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intravesical, intrameática e intrauretral. En determinadas realizaciones, la primera y segunda vía son diferentes y cada una se selecciona de parenteral, oral, enteral, sublingual, intranasal, intramuscular, intradérmica, intratumoral, intranodal, subcutánea, percutánea, transdérmica y tópica.

Cuando la composición inmunógena y la composición adyuvante se administran al sujeto por la misma vía, cada una de las composiciones puede administrarse en el mismo sitio en el sujeto o puede administrarse en diferentes sitios en el sujeto. En otras realizaciones específicas, cuando la composición adyuvante y la composición inmunógena se administran secuencialmente, cada composición puede suministrarse por una vía diferente, pero en sitios suficientemente próximos para considerarse el mismo sitio. A modo de ejemplo no limitante, puede administrarse una composición inmunógena por vía intramuscular en una extremidad del sujeto (por ejemplo, un brazo (músculo deltoides) o una pierna (músculo del muslo)) y antes de o posterior a la administración de la composición inmunógena, la composición adyuvante se administra por vía subcutánea en el mismo sitio en la extremidad del sujeto (por ejemplo, en el mismo brazo (músculo deltoides) o la misma pierna (músculo del muslo), respectivamente). A modo de segundo ejemplo no limitante, una composición adyuvante puede administrarse por vía intramuscular en una extremidad del sujeto (por ejemplo, un brazo (músculo deltoides) o una pierna (músculo del muslo)) y antes de o posterior a la administración de la composición adyuvante, la composición inmunógena se administra por vía subcutánea al mismo sitio en la extremidad del sujeto (por ejemplo, el mismo brazo (músculo deltoides) o la misma pierna (músculo del muslo), respectivamente).

Como se analiza en la presente memoria, la elección del sitio y la vía de administración puede depender de factores que incluyen, aunque no se limitan necesariamente a, la edad, estado salud y/o tamaño del sujeto a inmunizar; el vector de expresión recombinante o partícula de vector que comprende el vector; el inmunógeno o inmunógenos codificados por el vector de expresión recombinante; y/o el adyuvante. La afección, enfermedad o trastorno a tratar o evitar mediante la administración de la composición inmunógena y el tipo de respuesta inmunitaria deseada pueden ser factores adicionales considerados por un experto en la materia en la determinación de la vía de administración y el sitio de administración para maximizar el beneficio terapéutico y/o profiláctico de las composiciones inmunógenas y adyuvantes.

Durante el curso de un protocolo o pauta de inmunización, el nivel de la respuesta inmunitaria al inmunógeno puede controlarse. Por tanto, el número de veces que se administra la composición inmunógena y la composición adyuvante cada una al sujeto puede determinarse controlando el nivel de la respuesta inmunitaria al inmunógeno después de cada administración de la composición inmunógena. Las técnicas y métodos para controlar una

respuesta inmunitaria se ponen en práctica de forma rutinaria en la técnica y se describen en la presente memoria y en la técnica.

Respuesta inmunitaria

5 Como se describe en la presente memoria, se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno y, en realizaciones particulares, para atraer o reclutar las células inducidas a un sitio de interés (por ejemplo, a un tumor; sitio de infección en la mucosa). Las células del sistema inmunitario que están implicadas en una respuesta inmunitaria se mencionan, en general, como células inmunitarias e incluyen un linfocito o célula no linfocito tal como una célula accesoria. Los linfocitos son células que reconocen específicamente y responden a antígenos exógenos, y las células accesorias son aquellas que no son específicas para determinados antígenos, sino que están implicadas en las fases cognitiva y de activación de las respuestas inmunitarias. Por ejemplo, los fagocitos mononucleares (macrófagos), otros leucocitos (por ejemplo, granulocitos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y las células dendríticas funcionan como células accesorias en la inducción de una respuesta inmunitaria. La activación de linfocitos mediante antígeno exógeno da lugar a inducción y provocación de numerosos mecanismos efectores que funcionan eliminando el antígeno. Las células accesorias tales como los fagocitos mononucleares que afectan a o están implicado con los mecanismos efectores también se llaman células efectoras.

Las clases principales de linfocitos incluyen linfocitos B (células B), linfocitos T (células T) y linfocitos citolíticos naturales (NK), que son linfocitos granulares grandes. Los linfocitos B pueden producir anticuerpos. Los linfocitos T se subdividen además en linfocitos T auxiliares (CD4+ (también mencionado en la presente memoria y en la técnica como CD4)) y linfocitos T citolíticos o citotóxicos (CD8+ (también mencionado en la presente memoria y en la técnica como CD8)). Los linfocitos T también se describen en la técnica como linfocitos T CD4 y/o CD8 específicos de antígeno, linfocitos T de memoria efectores (T_{EM}), linfocitos T de memoria centrales (T_{CM}) y/o linfocitos T de memoria residentes en tejido (T_{RM}). Las células auxiliares secretan citocinas que promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y otras células, incluyendo linfocitos B y macrófagos, y reclutan y activan leucocitos inflamatorios. Otro subgrupo de linfocitos T, llamado linfocitos T reguladores o linfocitos T supresores suprimen de forma activa la activación del sistema inmunitario y evitan la autorreactividad patológica, es decir, enfermedad autoinmunitaria.

Los métodos descritos en la presente memoria para inducir una respuesta inmunitaria pueden inducir una respuesta humoral, también llamada respuesta de linfocitos B en la presente memoria y en la técnica, o pueden inducir una respuesta inmunitaria mediada por células que implica diversos tipos de células T (es decir linfocitos T). Una respuesta humoral incluye la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno (o inmunógeno). Los anticuerpos se producen mediante linfocitos B diferenciados conocidos como células plasmáticas. En una respuesta mediada por células, los diversos tipos de linfocitos T actúan eliminando un antígeno mediante varios mecanismos. Por ejemplo, los linfocitos T auxiliares que pueden reconocer antígenos específicos pueden responder liberando mediadores solubles tales como citocinas para reclutar células adicionales del sistema inmunitario para que participen en una respuesta inmunitaria. Además, los linfocitos T citotóxicos pueden reconocer específicamente un antígeno y pueden responder por unión a y destruyendo o dañando una célula o partícula que alberga antígeno.

Una respuesta inmunitaria en un hospedador o sujeto puede determinarse por innumerables métodos inmunológicos bien conocidos descritos en la presente memoria y con los que los expertos en la materia están familiarizados. Como se describe en la presente memoria, los métodos y técnicas para determinar la presencia y nivel de una respuesta inmunitaria incluyen, por ejemplo, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, polarización de la fluorescencia, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo, ensayos de proximidad de centelleo, ensayos de gen indicador, sustrato enzimático inactivado por fluorescencia, sustrato enzimático cromógeno y electroquimioluminiscencia, inmunoensayos (tales como ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo, inmunotransferencia, inmunohistoquímica y similares), resonancia de plasmones superficiales, ensayos basados en células tales como los que usan genes indicadores y ensayos funcionales (por ejemplo, ensayos que miden la función inmunitaria y la inmunosensibilidad).

Dichos ensayos incluyen, aunque no tienen que limitarse a ello, la determinación *in vivo* o *in vitro* de la presencia y nivel de anticuerpos solubles, mediadores solubles tales como citocinas (por ejemplo, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-6, IL-23, TNF- α y TGF- β), linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores del crecimiento y similares, así como otros mediadores solubles peptídicos pequeños, carbohidratados, nucleotídicos y/o lipídicos. Los inmunoensayos también incluyen la determinación de cambios en el estado de activación celular analizando las propiedades funcionales o estructurales alteradas de células del sistema inmunitario, por ejemplo, proliferación celular, movilidad alterada, inducción de actividades especializadas tales como expresión génica específica o comportamiento citolítico; maduración celular, tal como maduración de células dendríticas en respuesta a un estímulo; alteración en la relación entre una respuesta Th1 y una respuesta Th2; diferenciación celular por células del sistema inmunitario, incluyendo perfiles alterados de expresión de antígenos superficiales o la aparición de apoptosis (muerte celular programada). Otros métodos también disponibles para medir los marcadores de superficie celular para identificar diversas poblaciones de células inmunitarias tales como, aunque sin limitación, linfocitos T CD4 y/o CD8 específicos de antígeno, linfocitos T de memoria efectores (T_{EM}), linfocitos T de memoria centrales (T_{CM}) y/o linfocitos T de memoria residentes en tejido (T_{RM}). Los procedimientos para realizar estos ensayos y otros similares se pueden encontrar, por ejemplo, en Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998). Véase

también Current Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell y Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green y Reed, Science 281:1309 (1998) y referencias citados en los mismos).

5 Determinar la presencia y/o nivel de anticuerpos que se unen específicamente a un inmunógeno de interés puede determinarse usando uno cualquiera de varios inmunoensayos puestos en práctica de forma rutinaria en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, ELISA, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, inmunoelectroforesis a contracorriente, radioinmunoensayos, ensayos de transferencia puntual, ensayos de inhibición o competición, y similares (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4376110 y 4486530; Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). También pueden realizarse inmunoensayos para
10 determinar la clase e isotipo de un anticuerpo que se une específicamente a un inmunógeno. Los anticuerpos (policlonales y/o monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se unen específicamente a un inmunógeno y que pueden usarse como controles en inmunoensayos que detectan una respuesta inmunitaria específica de anticuerpo en un sujeto inmunizado, pueden prepararse en general por cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Peterson, ILAR J. 46:314-19 (2005); (Kohler *et al.*, Nature, 256:495-97 (1976); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6:511-19 (1975); Coligan *et al.* (ed.), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991); patentes de Estados Unidos n.º 4902614, 4543439 y 4411993; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett *et al.* (ed.) (1980); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); véase
20 también, por ejemplo, Brand *et al.*, Planta Med. 70:986-92 (2004); Pasqualini *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:257-59 (2004). El inmunógeno, o fragmentos inmunógenos del mismo, o una célula o partícula que alberga el inmunógeno o fragmento inmunógeno del mismo, puede usarse para inmunizar a un animal para la producción de anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

25 Los niveles de citocinas pueden determinarse de acuerdo con métodos descritos en la presente memoria y puestos en práctica en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, ELISPOT, tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo y combinaciones de los mismos (por ejemplo, tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo). La proliferación de células inmunitarias y la expansión clonal resultante de una provocación o estimulación específica de antígeno de una respuesta inmunitaria puede determinarse aislando linfocitos, tales como célula esplénicas o células de sangre periférica, muestras de aféresis, ganglios linfáticos, estimulando las células con antígeno y midiendo los marcadores de superficie celular, la producción de citocinas, la proliferación celular y/o viabilidad celular, tal como por incorporación de timidina tritiada o ensayos no radioactivos, tales como ensayos de MTT y similares. El efecto de un inmunógeno descrito en la presente memoria en el equilibrio entre una respuesta inmunitaria Th1 y una respuesta inmunitaria Th2 puede examinarse, por ejemplo, determinando los niveles de citocinas Th1, tales como IFN- γ , IL-12, IL-2 y TNF- β , y citocinas de tipo 2, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

35 El nivel de una respuesta de linfocitos T específicos de antiguo, por ejemplo, el nivel de una respuesta inmunitaria de CTL y/o el nivel de una respuesta de linfocitos T CD4 de memoria, puede determinarse por uno cualquiera de numerosos métodos inmunológicos descritos en la presente memoria y puestos en práctica de forma rutinaria en la técnica. El nivel de una respuesta inmunitaria de CTL puede determinarse antes de la administración de una cualquiera de las composiciones, vectores o partículas de vector descritas en la presente memoria y después usarse
40 para la comparación con el nivel de una respuesta inmunitaria de CTL en un punto temporal apropiado y/o ubicación después de una o más administraciones de las composiciones, vectores o partículas de vector que proporcionan ayuda a linfocitos T CD4 de memoria. Los ensayos de citotoxicidad para determinar la actividad CTL pueden realizarse usando una cualquiera de varias técnicas y métodos puestos en práctica de forma rutinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Henkart *et al.*, "Cytotoxic T-Lymphocytes" in Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003
45 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), páginas 1127-50 y referencias citadas en el mismo.

Por ejemplo, cuando la composición de sensibilización que comprende las partículas de vector que contienen el polinucleótido que codifica el inmunógeno y la composición de atracción que comprende una composición adyuvante se administran de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, el nivel de la respuesta inmunitaria de CTL o respuesta de linfocitos T CD8+, se potencia (mejora), en particular en el sitio de administración de la
50 composición de atracción que comprende un adyuvante. Por ejemplo, puede observarse una mejora de un 50 % cuando se mide por ensayos de linfocitos T funcionales tales como tinción de citocina intracelulares; ELISPOT; o medición de secreción de citocinas solubles por Luminex durante 1-4 semanas después de la administración de ambas composiciones. A este respecto, la mejora en general es en comparación con un control apropiado, tal como en ausencia de administración de una composición que comprende un adyuvante como se describe en la presente
55 memoria.

En realizaciones particulares, se observa un aumento de 2-50 veces en los linfocitos T específicos de antígeno de infiltración local siguiendo los métodos descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, se observa un aumento de 2-40 veces, un aumento de 2-30 veces, un aumento de 2-20 veces, un aumento de 2-10 veces, un aumento de 3-8 veces, un aumento de 4-7 veces o un aumento 5-6 veces en los linfocitos T específicos de antígeno de infiltración local. (por ejemplo, de infiltración tumoral). En general, el aumento en los linfocitos T específicos de antígeno de infiltración local es en comparación con el número de linfocitos T específicos de antígenos de infiltración local presentes en ausencia de una administración de "atracción" o en comparación en una administración de control

apropiada. En general, los métodos de la presente memoria proporcionan un aumento de una manera estadística, biológica y/o clínicamente significativa de los linfocitos T específicos de antígeno de infiltración local en comparación con un control apropiado en ausencia de administración del adyuvante.

5 Como se usa en la presente memoria, el compañero de unión o un anticuerpo se dice que es "inmuno específico", "específico para" o que "se une específicamente" a un inmunógeno de interés si el anticuerpo reacciona a un nivel detectable con el inmunógeno o fragmento inmunógeno del mismo, preferiblemente con una constante afinidad, K_a , de más de o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1} , o de más de o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1} , de más de o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , de más de o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} o de más de o igual a aproximadamente 10^8 M^{-1} . La afinidad de un anticuerpo por su antígeno afín también se expresa habitualmente como una constante de disociación K_D , y un anticuerpo se une específicamente al inmunógeno de interés si se une con una K_D de menos de o igual a 10^{-4} M , menos de o igual a aproximadamente 10^{-5} M , menos de o igual a aproximadamente 10^{-6} M , menos de o igual a 10^{-7} M o menos de o igual a 10^{-8} M .

15 Las afinidades de los compañeros de unión o anticuerpos pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949)) y por resonancia de plasmones superficiales (SPR; BIAcore™, Biosensor, Piscataway, NJ). Para resonancia de plasmones superficiales, las moléculas diana se inmovilizan en una fase sólida y se exponen a un compañero de unión (o ligando) en una fase móvil que discurre a lo largo de una célula de flujo. Si se produce la unión del ligando a una diana inmovilizada, el índice de refracción local cambia, dando lugar a un cambio en el ángulo de SPR, que puede controlarse en tiempo real detectando cambios en la intensidad de la luz reflejada. Las tasas de cambio de la señal de SPR pueden analizarse para producir constantes de velocidad aparentes para las fases de asociación y disociación de la reacción de unión. La relación de estos valores da la constante en equilibrio aparente (afinidad) (véase, por ejemplo, Wolff *et al.*, Cancer Res. 53:2560-2565 (1993)).

25 Una muestra biológica puede obtenerse del sujeto para determinar la presencia y nivel de una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno en el sujeto que ha recibido una composición que comprende una partícula de vector que contiene un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica al menos un inmunógeno y una composición que comprende un adyuvante de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Una "muestra biológica", como se usa en la presente memoria, puede ser una muestra de sangre (de la que puede prepararse suero o plasma), muestra de aféresis, pieza de biopsia, líquidos corporales (por ejemplo, lavado pulmonar, líquido ascítico, lavados de la mucosa, líquido sinovial), médula ósea, ganglios linfáticos, explante tisular, cultivo de órganos o cualquier otro tejido o preparación celular del sujeto o una fuente biológica.

30 Con respecto a todos los inmunoensayos y métodos descritos en la presente memoria para determinar una respuesta inmunitaria, un experto en la materia también apreciará fácilmente y comprenderá los controles que se incluyen apropiadamente cuando se ponen en práctica estos métodos. Las concentraciones de los componentes de reacción, tampones, temperatura y periodo de tiempo suficientes para permitir la interacción de los componentes de reacción pueden determinarse y/o ajustarse de acuerdo con métodos descritos en la presente memoria y con lo que los expertos en la materia están familiarizados.

Métodos de uso y composiciones

35 Una vez se ha identificado un antígeno y seleccionado como inmunógeno para inducir una respuesta inmunitaria, se identifica y selecciona una secuencia polinucleotídica que codifica el inmunógeno deseado. El vector de expresión recombinante que comprende la secuencia polinucleotídica o una partícula de vector que comprende el vector se formula entonces en una composición inmunógena con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente adecuado. Como se describe en la presente memoria, un adyuvante se formula con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente adecuado. Tanto la composición inmunógena como la composición adyuvante se formulan de una manera apropiada para el inmunógeno y el adyuvante, respectivamente, y para la vía (o modo) de administración.

40 Como se describe en la presente memoria, se administra al menos un inmunógeno o composición inmunógena a un sujeto que lo necesita en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria eficaz, que puede ser una respuesta humoral eficaz y/o una respuesta inmunitaria mediada por células eficaz (que puede incluir una respuesta de linfocitos T citotóxicos). Sin limitarse a teoría alguna, como se describe en la presente memoria, el adyuvante o composición adyuvante administrada al sujeto induce la expresión de citocinas (por ejemplo, Cxcl9, Cxcl10, CCL2, CCL3, MCP-1, TNF α , IFN γ e IP-10) que reclutan linfocitos T CD8 (por ejemplo, el sitio local de administración, tal como en el sitio de un tumor o la vejiga) y/o potencia o mejora la respuesta inmunitaria contra al menos un inmunógeno.

45 Las composiciones inmunógenas, composiciones adyuvantes, vectores de expresión recombinantes y partículas de vector, por lo tanto, pueden ser útiles en métodos para prevenir (es decir, reducir la probabilidad de aparición o reaparición de) y/o tratar una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un cáncer, en particular cánceres inducidos por virus. El inmunógeno es un antígeno de virus oncogénico o un antígeno asociado a tumor que se cree que se expresa o se sabe que se expresa por una o más de las células cancerosas particulares.

La presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para prevenir, mejorar o tratar un cáncer mediante las pautas de administración de sensibilización-atracción descritas en la presente memoria, en los que el método comprende la administración de una primera composición de sensibilización que comprende un vector de expresión recombinante que expresa un inmunógeno (por ejemplo, uno o más antígenos asociados a cáncer), seguida de administración de una composición de atracción que comprende un agonista de TLR4, tal como GLA, en ausencia de antígeno (pero, opcionalmente, con uno o más antígenos asociados a tumor), administrada de forma local en el sitio del cáncer o tumor (por ejemplo, por vía intratumoral, peritumoral, intranodal, perinodal, a la mucosa, intravesical).

En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para prevenir, mejorar o tratar un cáncer donde el cáncer comprende uno o más tumores que son accesibles para permitir la inyección directa en o alrededor del tumor de la composición de atracción que comprende un agonista de TLR4 como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el cáncer comprende un tumor sólido. En algunas realizaciones, el tumor sólido es un carcinoma, un sarcoma o un linfoma. A este respecto, aunque los linfomas en general se consideran tumores líquidos, pueden formarse tumores "sólidos" accesibles en el ganglio linfático y, por tanto, pueden tratarse usando las pautas de sensibilización-atracción descritas en la presente memoria.

La presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para prevenir, mejorar o tratar un cáncer inducido por virus por las pautas de administración de sensibilización-atracción descritas en la presente memoria, en los que el método comprende la administración de una primera composición de sensibilización que comprende un vector de expresión recombinante que expresa un inmunógeno (por ejemplo, uno o más antígenos víricos donde el virus es un virus oncógeno asociado con cáncer), seguida de la administración de una composición de atracción que comprende un agonista de TLR4 tal como GLA, opcionalmente con uno o más antígenos víricos y/o uno o más antígenos asociados a tumor, administrada de forma local en el sitio del cáncer o tumor (por ejemplo, por vía intratumoral, a la mucosa, intravesical). Los cánceres inducidos por virus ejemplares que pueden tratarse o mejorarse por los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, cáncer de vejiga, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, cáncer hepático, glioblastoma, linfoma de Burkitt, linfoma no hodgkiniano, trastorno linfoproliferativo postrasplante, cáncer nasofaríngeo, carcinoma cervicouterino, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y leucemia/linfoma de linfocitos T en el adulto.

En determinadas realizaciones, las pautas de administración de sensibilización-atracción descritas en la presente memoria se administran junto con uno o más agentes terapéuticos diferentes. Por tanto, en determinadas realizaciones, también se contempla la administración de composiciones que comprenden un GLA de esta divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes (por ejemplo, otros agentes antineoplásicos u otro tratamiento paliativo o adyuvante). En determinadas realizaciones, dichos agentes terapéuticos pueden estar aceptados en la técnica como tratamiento convencional para un cáncer particular como se describe en la presente memoria. Los agentes terapéuticos ejemplares contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, DMARD, antiinflamatorios, inhibidores del punto de control inmunitario, quimioterápicos, radioterápicos y otros agentes activos y complementarios.

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria se usan junto con uno o más agentes antineoplásicos, incluyendo uno o más agentes quimioterápicos. Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aciridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaninas incluyendo alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, teropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antisuiprarrenales tales como aminoglutetimidina, mitotano, trilostano; renovador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaciuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbicina; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaciuona; 2,2', 2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbicina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C") ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; trastuzumab, docetaxel, platino;

etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina vinorelbina; navelbina; novantrona tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomina (DMFO); derivados del ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (difitox denileucina); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrogénicos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Agentes antineoplásicos adicionales incluyen sorafenib y otros inhibidores de proteína cinasa tales como afatinib, axitinib, bevacizumab, cetuximab, crizotinib, dasatinib, erlotinib, fostamatinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, mubritinib, nilotinib, panitumumab, pazopanib, pegaptanib, ranibizumab, ruxolitinib, trastuzumab, vandetanib, vemurafenib, y sunitinib; sirolimús (rapamicina), everolimús y otros inhibidores de mTOR.

En otra realización, los métodos de la presente memoria se administran en combinación con otro agente inmunoestimulador. Dichos agentes inmunoestimuladores incluyen, aunque sin limitación, N-acetilmuramilo-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón- γ y anticuerpos anti-CD40 u otros anticuerpos que se unen a y activan las rutas coestimuladoras (por ejemplo, CD28, ICOS, OX40, CD27 y similares).

En una realización, los métodos de la presente memoria se usan en combinación con uno o más inhibidores del punto de control inmunitario. Los puntos de control inmunitario se refieren a una diversidad de rutas inhibitorias del sistema inmunitario que son cruciales para mantener la autotolerancia y para modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias. Los tumores usan determinadas rutas de punto de control inmunitario como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria, particularmente contra linfocitos T que son específicos para antígenos tumorales (véase, por ejemplo, Pardoll, 2012 Nature 12:252; Chen y Mellman 2013 Immunity 39:1). La presente divulgación proporciona inhibidores del punto de control inmunitario que pueden administrarse en combinación con las composiciones de GLA sin antígeno. Dichas politerapias trabajan en concierto potenciando una respuesta inmunitaria antineoplásica. Determinados virus también han desarrollado mecanismos para cooptar rutas de punto de control inmunitario. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, dicha politerapia puede usarse para potenciar una respuesta inmunitaria antiviral.

Los inhibidores de punto de control inmunitario incluyen cualquier agente que bloquee o inhiba de una manera estadística, clínica o biológicamente relevante las rutas inhibitorias del sistema inmunitario. Dichos inhibidores pueden incluir inhibidores de molécula pequeña o pueden incluir anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a y bloquean o inhiben los receptores del punto de control inmunitario o anticuerpos que se unen a y bloquean o inhiben los ligados del receptor del punto de control inmunitario. Las moléculas de punto de control inmunitario ilustrativas que pueden abordarse para el bloqueo o inhibición incluyen, aunque sin limitación, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de moléculas de CD2 y se expresa en todos los linfocitos NK, $\gamma\delta$ y T CD8⁺ de memoria ($\alpha\beta$)), CD160 (también mencionado como BY55) y CGEN-15049. Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, u otras proteínas de unión, que se unen a y bloquean o inhiben la actividad de uno o más de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 y CGEN-15049. Los inhibidores del punto de control inmunitario ilustrativos incluyen Tremelimumab (anticuerpo que bloquea CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y Yervoy/ipilimumab (inhibidor del punto de control anti-CTLA-4).

En una realización adicional, los métodos de administración de sensibilización-atracción de la presente memoria se usan junto con otros agonistas de TLR4 o un agonista de TLR8 o un agonista de TLR9. Dicho agonista puede seleccionarse de peptidoglucano, poliI:C, CpG, 3M003, flagelina y homólogo de *Leishmania* del factor 4a de elongación e iniciación ribosómico eucariota (LeIF).

En una realización adicional, las pautas de administración de sensibilización-atracción de la presente memoria se usan junto con otro con una o más citocinas. Por "citocina" se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas las hormonas del crecimiento tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humana N-metilada y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteínicas tales como hormona foliculoestimulante (FSH), tirotropina (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina, trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervios tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores

osteoinductores; interferones tales como interferón-alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Tal como se usa en la presente memoria, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

En determinadas realizaciones, los métodos de administración de sensibilización-atracción de la presente memoria se usan junto con cloroquina, un agente lisosomotrópico que evita la acidificación endosómica y que inhibe la autofagia inducida por células tumorales para sobrevivir al crecimiento celular acelerado y la privación de nutrientes. Más en general, las composiciones que comprenden GLA como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con agentes terapéuticos que actúan como inhibidores de autofagia, radiosensibilizadores o quimiosensibilizadores, tales como cloroquina, misonidazol, metronidazol y citotoxinas hipóxicas, tales como tirapazamina. A este respecto, dichas combinaciones de un GLA con cloroquina u otro radio o quimiosensibilizador, o inhibidor de autofagia, pueden usarse en combinación adicional con otros agentes antineoplásicos o con radioterapia.

En otra realización, los métodos de administración de sensibilización-atracción en la presente memoria se usan junto con otros fármacos de molécula pequeña que se sabe que provocan la destrucción de células tumorales con activación concomitante de respuestas inmunitarias, llamada muerte celular inmunógena", tales como ciclofosfamida, doxorubicina, oxaliplatino y mitoxantrona. Además, combinaciones con fármacos que se sabe que potencian la inmunogenicidad de células tumorales tales como patupilona (epotilona B) anticuerpo monoclonal dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) 7A7.27, inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo, vorinostat, romidepsina, panobinostat, belinostat y entinostat), el ácido docosahexaenoico de ácido graso n3-poliinsaturado, además inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib), shikonina (el constituyente principal de la raíz de *Lithospermum erythrorhizon*) y virus oncolíticos tales como TVec (talimogén laherparepvec). En otras realizaciones, las composiciones que comprenden GLA como se describe en la presente memoria pueden administrarse en combinación con tratamientos epigenéticos, tales como inhibidores de ADN metiltransferasa (por ejemplo, Decitabina, 5-aza-2'-desoxicitidina) que pueden administrarse de forma local o sistémica.

En otra realización, los métodos de administración de sensibilización-atracción de la presente memoria se usan junto con uno o más anticuerpos que aumentan la captación de ADCC de las células tumorales por las DC. Por tanto, la presente invención contempla combinar composiciones que comprenden un GLA con cualquier molécula que induzca o potencie la ingesta de una célula tumoral o sus fragmentos por una célula presentadora de antígeno y la posterior presentación de antígenos tumorales al sistema inmunitario. Estas moléculas incluyen agentes que inducen la unión del receptor (tales como receptores de Fc o de manosa) y el transporte en la célula presentadora de antígeno tal como anticuerpos, moléculas de tipo anticuerpo, moléculas multivalentes multiespecíficas y polímeros. Dichas moléculas pueden administrarse por vía intratumoral con la composición que comprende GLA, o administrarse por una vía diferente. Por ejemplo, una composición que comprende GLA como se describe en la presente memoria puede administrarse de forma intratumoral junto con inyección intratumoral de rituximab, cetuximab, trastuzumab, Campath, panitumumab, ofatumumab, brentuximab, pertuzumab, Ado-trastuzumab emtansina, Obinutuzumab, anticuerpos anti-HER1, -HER2 o -HER3 (por ejemplo, MEHD7945A; MM-111; MM-151; MM-121; AMG888), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, Nimotuzumab, ABT-806), u otros anticuerpos similares. Cualquier estructura multivalente que pueda acoplar receptores de Fc y otros receptores que puedan inducir la internalización pueden usarse en las politerapias descritas en la presente memoria, por ejemplo, péptidos y/o proteínas que pueden unirse a dianas que están unidas a fragmentos Fc o polímeros que pueden acoplar receptores.

En determinadas realizaciones, los métodos de administración de sensibilización-atracción de la presente memoria se usan junto con otro anticuerpo que promueve una señal coestimuladora (por ejemplo, bloqueando rutas inhibitorias), tal como anti-CTLA-4, o que activa rutas coestimuladoras tales como un anticuerpo anti-CD40, anti-CD28, anti-ICOS, anti-OX40, anti-CD27 y similares.

Los métodos de administración de sensibilización-atracción de la presente memoria pueden usarse en solitario o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como radioterapia, inhibidores del punto de control inmunitario, quimioterapia y otros agentes antineoplásicos, trasplante, inmunoterapia, hormonoterapia, tratamiento fotodinámico, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos.

Como entienden los expertos en la materia médica, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a control médico de una enfermedad, trastorno o afección de un sujeto (es decir, paciente) (véase, por ejemplo, Diccionario Médico de Stedman). En general, una dosis y pauta de tratamiento apropiadas proporcionan el inmunógeno y el adyuvante en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico y/o profiláctico. El beneficio terapéutico y/o profiláctico incluye, por ejemplo, un resultado clínico mejorado, medidas tanto de tratamiento terapéutico como profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar o retardar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, o prevenir o ralentizar o retardar (reducir) la expansión o gravedad de dicha enfermedad o trastorno. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados de tratar a un sujeto incluyen, aunque sin imitación, supresión, reducción o alivio de los síntomas que son el resultado de o están asociados con la enfermedad o

trastorno a tratar; aparición disminuida de síntomas; calidad de vida mejorada; estado sin enfermedad más largo (es decir, disminuyendo la probabilidad o la propensión de que un sujeto presente síntomas en cuya base se hace un diagnóstico de una enfermedad); disminución del grado de la enfermedad; estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la enfermedad; retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad; mejora o paliación del estado patológico; y remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable; y/o supervivencia global. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si un sujeto no estuviera recibiendo tratamiento. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen una enfermedad o trastorno, así como sujetos propensos a tener o en riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno. Los sujetos que necesitan tratamiento profiláctico incluyen sujetos en los que tiene que prevenirse la enfermedad, afección o trastorno (es decir, disminuyendo la probabilidad de aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno).

Los vectores de expresión recombinantes y partículas de vector pueden administrarse a un sujeto en un excipiente o vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable o adecuado. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles, por ejemplo, disolución salina fisiológica, que se describen en mayor detalle en la presente memoria, que son adecuados para su administración a un ser humano u otro sujeto no humano incluyendo un sujeto mamífero no humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz proporciona una cantidad del polinucleótido que puede producir un resultado medicamente deseable (es decir, se expresa una cantidad suficiente del inmunógeno para inducir o potenciar la respuesta inmunitaria específica para el inmunógeno (respuesta humoral y/o mediada por células, incluyendo respuesta de linfocitos T citotóxicos) de una manera estadística, biológica y/o significativa) en un ser humano o animal no humano tratado. Como es bien sabido en las técnicas médicas, la dosificación para un paciente cualquiera depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y vía de administración, la salud general y otros fármacos que se están administrando simultáneamente. Las dosis variarán, pero una dosis preferida para la administración de una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante es suficiente para proporcionar de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula polinucleotídica de vector.

Las composiciones farmacéuticas, incluyendo las composiciones inmunógenas y adyuvantes descritas en la presente memoria, pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir) que se determina por expertos en la materia médica. Una dosis apropiada y una duración y frecuencia adecuadas de administración se determinarán por factores tales como el estado del paciente, el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del principio activo y el método de administración. En general, una dosis y pauta de tratamiento apropiadas proporcionan la composición o composiciones en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico y/o profiláctico (tal como se describe en la presente memoria, incluyendo un resultado clínico mejorado, tal como remisiones completas o parciales más frecuentes, o supervivencia sin enfermedad y/o global más larga, o una reducción de la gravedad de los síntomas). Para uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retardar la aparición de o disminuir la gravedad de una enfermedad asociada con enfermedad o trastorno.

En general, la cantidad de un inmunógeno, incluyendo polipéptidos de fusión como se describe en la presente memoria, presente en una dosis, o producida *in situ* por un polinucleótido codificante presente en una dosis, varía de aproximadamente 0,01 μg o aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del hospedador. El uso de la dosis mínima que es suficiente para proporcionar tratamiento eficaz es habitualmente preferido. Los pacientes en general pueden controlarse para la eficacia terapéutica o profiláctica usando ensayos adecuados para la afección que se está tratando o previniendo, que son ensayos que serán familiares para los expertos en la materia y que se describen en la presente memoria. Cuando se administran en una forma líquida, los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente variarán de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 ml (que comprende de aproximadamente 0,01 μg a aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para un sujeto de 10-60 kg. Las dosis óptimas pueden determinarse en general usando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima puede depender de la más corporal, el peso o el volumen de sangre del sujeto. Como se describe en la presente memoria, la dosis apropiada también puede depender del estado del paciente (por ejemplo, ser humano), es decir, el estadio de la enfermedad, el estado de salud general, así como la edad, género y peso, y otros factores familiares para un experto en la materia médica.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier manera apropiada de administración incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, enteral, nasal (es decir, intranasal), por inhalación, intratecal, rectal, vaginal, intraocular, subconjuntival, sublingual, intradérmica, intranodal, intratumoral, transdérmica o parenteral, incluyendo inyección o infusión subcutánea, percutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intrameática o intrauretral. Los métodos de administración se describen en mayor detalle en la presente memoria.

Para administración parenteral, el vehículo preferiblemente comprende agua, disolución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, puede emplearse cualquiera de los excipientes anteriores o un excipiente o vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, glucosa, sacarosa y/o carbonato de magnesio.

Una composición inmunógena y una composición que comprende la construcción de vector recombinante o la partícula de vector pueden formularse para suministro por cualquier vía que proporcione una dosis eficaz del inmunógeno. Dichos métodos de administración incluyen administración oral o suministro por inyección o pueden ser en forma de un líquido. Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, preferiblemente disolución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos; antioxidantes; agentes quelantes; tampones y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechas de vidrio o plástico. Se prefiere el uso de disolución salina fisiológica, y una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Para composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de ácido nucleico, tal como los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria, la molécula de ácido nucleico puede estar presente dentro de cualquiera de una diversidad de sistema de suministro conocidos para los expertos en la materia, incluyendo ácido nucleico y sistemas de expresión bacterianos, víricos y de mamífero tales como, por ejemplo, partículas de vector y construcciones de expresión recombinantes como se proporciona en la presente memoria. Las técnicas para incorporar un polinucleótido (por ejemplo, ADN) en dichos sistemas de expresión son bien conocidas para los expertos en la materia. En otras determinadas realizaciones, el ADN también puede estar "desnudo", como se describe, por ejemplo, en Ulmer *et al.*, *Science* 259:1745-49, 1993 y revisado por Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo puede aumentarse recubriendo el ADN en microesferas biodegradables, que se transportan de forma eficaz al interior de las células.

Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse a una célula de acuerdo con uno cualquiera de los varios métodos descritos en la presente memoria (véase, por ejemplo, Akhtar *et al.*, *Trends Cell Bio.* 2:139 (1992); *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995, Maurer *et al.*, *Mol. Membr. Biol.* 16:129-40 (1999); Hofland y Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.* 137:165-92 (1999); Lee *et al.*, *ACS Symp. Ser.* 752:184-92 (2000); patente de Estados Unidos n.º 6395713; publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 94/02595; Selbo *et al.*, *Int. J. Cancer* 87:853-59 (2000); Selbo *et al.*, *Tumour Biol.* 23:103-12 (2002); publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2001/0007666 y 2003/077829). Dichos métodos de suministro conocidos para los expertos en la materia incluyen, aunque sin restricción, encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables; hidrogeles; ciclodextrinas (véase, por ejemplo, Gonzalez *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 10:1068-74 (1999); Wang *et al.*, publicaciones de solicitud internacional n.º WO 03/47518 y WO 03/46185); poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y microesferas de PLGA (también útiles para el suministro de péptidos y polipéptidos y otras sustancias) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6447796; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/130430); nanocápsulas biodegradables; y microesferas bioadhesivas, o por vectores proteínicos (publicación de solicitud internacional n.º WO 00/53722. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico también pueden formularse o formar complejos con polietilenimina y derivados de la misma, tal como polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o derivados de polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL) (véase también, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0077829)

En realizaciones particulares de los métodos descritos en la presente memoria, el sujeto es un ser humano o animal no humano. Un sujeto que necesita los tratamientos descritos en la presente memoria puede mostrar síntomas o secuelas de una enfermedad, trastorno o afección descrita en la presente memoria y puede estar en riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno o afección. Los animales no humanos que pueden tratarse incluyen mamíferos, por ejemplo, primates no humanos (por ejemplo, mono, chimpancé, gorila y similares), roedores (por ejemplo, ratas, ratones, gerbos, hámsteres, hurones, conejos), lagomorfos, porcinos (por ejemplo, cerdos, cerdos enanos), équidos, cánidos, félidos, bovinos y otros animales domésticos, de granja y zoológico.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden estar en diversas formas, por ejemplo, en forma sólida, líquida, de polvo, acuosa o liofilizada. Los ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados y vehículos para administrar una partícula de vector, incluyendo una partícula de vector vírico y una partícula de vector bacteriano, composiciones inmunógenas y vectores de expresión recombinantes, son conocidos en la técnica. Dichos excipientes, vehículos y/o aditivos pueden formularse por métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. Los agentes estabilizantes tales como lípidos, inhibidores de nucleasa, polímeros y agentes quelantes que pueden incluirse en las composiciones descritas en la presente memoria pueden ayudar a la conservación de las composiciones y componentes de las composiciones de la degradación dentro del organismo.

Las partículas de vector, incluyendo una partícula de vector vírico y una partícula de vector bacteriano, composiciones inmunógenas, composiciones adyuvantes y vectores de expresión recombinantes proporcionados en la presente memoria pueden envasarse como kits. Los kits pueden incluir opcionalmente uno o más componentes tales como instrucciones de uso, dispositivos y reactivos adicionales y componentes, tales como tubos, recipientes, por ejemplo, viales y jeringas para la práctica de los métodos. Los kits ejemplares pueden incluir opcionalmente instrucciones de uso, un dispositivo o reactivos para detectar una partícula de vector, el vector de expresión recombinante o el inmunógeno en un sujeto, y un dispositivo para administrar la composición o composiciones a un sujeto.

También se contemplan en la presente memoria kits que comprenden polinucleótidos que codifican un inmunógeno. Dicho kit también puede incluir al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetado de virus y un vector que codifica la variante de glucoproteína E2 del virus Sindbis. Algunos kits contendrán al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetado del virus, un virus que codifica la variante de glucoproteína E2 del virus Sindbis y un vector que codifica al menos un factor de maduración de DC.

Los kits que comprenden un vector vírico que codifica una secuencia de interés (que codifica típicamente un antígeno o inmunógeno) y, opcionalmente, una secuencia polinucleotídica que codifica un factor de maduración de DC también se contemplan en la presente memoria. En algunos kits, el kit incluye al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetado de virus y un vector que codifica la variante de glucoproteína E2 del virus Sindbis.

Un kit también puede contener instrucciones. Las instrucciones típicamente describen métodos para la administración, incluyendo métodos para determinar el estado apropiado del sujeto, la cantidad de dosificación apropiada y el método de administración apropiado, para administrar la composición. Las instrucciones también pueden incluir directrices para controlar al sujeto mientras dure el tiempo de tratamiento.

Los kits proporcionados en la presente memoria también pueden incluir un dispositivo para administrar una composición inmunógena que comprende una partícula de vector que comprende un vector de expresión recombinante y/o una composición adyuvante a un sujeto. Puede incluirse cualquiera de una diversidad de dispositivos conocidos en la técnica para administrar medicaciones o vacunas en los kits proporcionados en la presente memoria. Los dispositivos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dosificador de líquidos, tal como un cuentagotas. Típicamente, el dispositivo para administrar una composición es compatible con los componentes activos del kit. Por ejemplo, un dispositivo de inyección sin aguja tal como un dispositivo de inyección de alta presión puede incluirse en kits con partículas de vector, polinucleótidos y polipéptidos no dañados por la inyección a alta presión, pero típicamente no se incluye en kits que incluyen partículas de vector, polinucleótidos y polipéptidos que pueden dañarse por inyección de alta presión.

Otras realizaciones y usos serán evidentes para los expertos en la materia a luz de las presentes divulgaciones. Los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente como ilustrativos de diversas realizaciones y no deben interpretarse limitando la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: Reclutamiento de linfocitos T CD8 a la vejiga

Se realizan estudios en ratones para demostrar que los linfocitos T CD8 generados por inmunización subcutánea pueden reclutarse a la vejiga. Se inmunizan grupos de ratones BALB/C (incluyendo grupos de control apropiados; 5 ratones por grupo) mediante la base de cola con diferentes dosis (10E8, 10E9, 10E10) de un vector lentivírico recombinante como se describe en la presente memoria en hasta tres puntos temporales (por ejemplo, 0, 2, 4 semanas). Una semana después de la última inmunización, se instila a los ratones semanalmente con BCG (cepa TICE) a 1 mg/ml, con 5-8 x 10E7 UFC/ml, para 6 instilaciones, siguiendo procedimientos establecidos, o dos veces a la semana con 5 µg de GLA formulado como una emulsión estable al 2 %. Una semana después de la última instilación de GCG/GLA, los ratones se sacrifican y se retiran sus vejigas. De cada vejiga se preparan secciones histológicas, se fijan y tiñen con los anticuerpos apropiados para la detección y tipado de las células inmunitarias tales como linfocitos NK, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, etc. siguiendo protocolos establecidos. Además, una parte de cada célula de vejiga se somete a digestión con colagenasa, se aíslan los linfocitos T usando microesferas magnéticas, se tiñen con pentámeros para linfocitos T CD8 específicos de epítipo NY-ESO-1 y se analizan en flujo, siguiendo protocolos establecidos.

Se usa un modelo de cáncer de vejiga de ratón ortotópico establecido basado en la línea celular de tumor de ratón MB-49 para determinar la eficacia inmunológica y clínica del tratamiento (Durek 2002; y Kang, M. R., *et al.*, J. Vis. Exp. (65), e4207, (2012)). Usando un vector lentivírico recombinante de integración como se describe en la presente memoria que codifica NY-ESO-1, se generan clones recombinantes de MB-49 que expresa NY-ESO-1 y se ensayan para la cinética de crecimiento tumoral después del implante en la vejiga. Los ratones con tumores establecidos se someten a los tratamientos resumidos en (1), y se controla el efecto clínico sobre los tumores mediante métodos apropiados *in vivo* (por ejemplo, imágenes de ultrasonidos), mediciones morfométricas después del sacrificio de los ratones en puntos temporales predefinidos y análisis de linfocitos de infiltración tumoral (Watkins, S. K., *et al.*, J. Vis. Exp. (64), e3952, (2012)).

Ejemplo 2: Sensibilización con vector lentivírico seguido de administración de GLA intratumoral "atrae" de forma eficaz linfocitos T CD8 específicos de antígeno al tumor

Este ejemplo demuestra que la administración intratumoral de GLA después de la inmunización con vacuna de vector "atrae" linfocitos T CD8 específicos de antígeno inducidos por vector al tumor.

En este estudio, en el día 0, se inocularon ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) con 1 X 10⁶ células B16F10-OVA, por vía subcutánea en la almohadilla plantar. En día 10, los ratones se inmunizaron con 2 X 10¹⁰ genomas de

VP02/OVA (o vector de control, VP02/GFP) mediante administración en la base de la cola. En día 21, a los ratones se les dio una administración intratumoral de 5,0 µg de GLA/SE al 2 %. Los tumores se recogieron y analizaron para linfocitos de infiltración tumoral mediante citometría de flujo inmediatamente antes de (D+0), un día después de (D+1) o dos días después de (D+2) administración de GLA.

- 5 Como se esperaba, se encontraron pocos linfocitos T CD8 específicos de OVA en tumores de ratones inmunizados con el vector de control, VP02/GFP (figura 1A, paneles superiores). En el día 0, se encontró un promedio de un 1,9 % de linfocitos T CD8 específicos de OVA en tumores de ratones inmunizados con VP02/OVA, lo que indica que algunas células específicas de antígeno positivas para CD8 sensibilizadas por el vector se infiltraban en el tumor. El día 1 y 2 después de la administración de GLA, se encontró un promedio de un 2,7 % y un 3,4 %, respectivamente, de linfocitos T CD8 específicos de OVA en tumores de ratones inmunizados con VP02/OVA, en comparación con un 1,9 % antes de la administración de GLA (figura 1B) lo que indica que la administración intratumoral de GLA provocaba la atracción de linfocitos T específicos de antígeno CD8 en el tumor. En 48 horas desde la administración de GLA, hubo un promedio de un aumento de 7 veces en el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de Ag en tumores tratados en comparación con tumores no tratados (n=5). La relación del % de linfocitos T CD8 específicos de OVA encontrados en tumores de ratones inmunizados con vector sobre ratones no inmunizados aumentó 1-8 veces el día 1 y 2 después de la administración de GLA.

Los datos anteriores demuestran que una vez se han generado de forma sistémica ("sensibilización") linfocitos T CD8 específicos de antígeno, la administración local de un adyuvante en el sitio del tumor "atrae" estos linfocitos T CD8 al tumor, lo que media la inmunidad protectora. Estos datos apoyan el uso de "sensibilización-atracción" como estrategia de vacuna prometedor para inmunoterapia del cáncer.

Ejemplo 3: Evaluación de eficacia terapéutica de la estrategia de sensibilización-atracción

Este ejemplo demuestra que la administración intratumoral de GLA después de la inmunización con vacuna de vector "atrae" linfocitos T CD8 específicos de antígeno inducidos por vector al tumor y demuestra además la eficacia terapéutica de la estrategia de sensibilización-atracción.

- 25 En este estudio, el día 0, se inoculó a ratones hembra C57BL/6 o BALB/c (5 ratones por grupo) 1×10^5 células B16F10-OVA o células CT26, respectivamente, por vía subcutánea en el lomo. En el día 7, los ratones se inmunizaron con 2×10^{10} genomas de VP02/OVA (C57BL/6) o VP02/AH1A5 (BALB/C) (o vector de control, VP02/GFP) mediante administración en la base de la cola. Empezando en el día 7 o 14, a los ratones se les dio una administración intratumoral de 5,0 µg GLA/SE al 2 % cada 3-4 días. En el día 18 (un día después del último tratamiento con GLA/SE), los tumores B16F10-OVA se recogieron y analizaron para linfocitos de infiltración tumoral mediante citometría de flujo.

Los ratones inmunizados con el vector de control (VP02/GFP) tenían un 1,8 % de linfocitos que se infiltraban en el tumor (figura 2A). GLA/SE en solitario no aumentaba el porcentaje de infiltración de linfocitos. VP02/OVA en solitario aumentaba el % de infiltración de linfocitos hasta un 3,2 %, mientras que VP02/OVA + GLA/SE aumentaba adicionalmente el % de infiltración de linfocitos hasta un 7,5 %, para un total de aumento de 4 veces por encima de la medida inicial en linfocitos de infiltración tumoral. De los linfocitos encontrados en el tumor, VP02/OVA en solitario generaba un 16,6 % de linfocitos T CD8 específicos de OVA en comparación con un 0,9 % de los ratones de control, mientras que GLA/SE en solitario generaba un 14,7 % de linfocitos T reguladores en comparación con un 9,7 % de ratones de control. Estos hallazgos indican que los linfocitos T CD8 específicos de antígeno generados por vector viajaban al tumor, y que, en ausencia de una sensibilización específica de antígeno, GLA/SE atraía principalmente linfocitos T reguladores al sitio. En presencia de una sensibilización específica de antígeno, sin embargo, aunque GLA/SE seguía atrayendo linfocitos T reguladores al tumor, también atraía más linfocitos T CD8 específicos de antígeno al tumor (figura 2B).

En ambos modelos de tumor B16-OVA y CT26, la estrategia de sensibilización-atracción conseguía el mejor control tumoral en ratones (figura 3). Sorprendentemente, la estrategia de sensibilización-atracción conseguía regresión completa en el modelo CT26 al menos tanto como 60 días después de la inoculación del tumor (experimento aún en curso) (figura 3B, rombos vacíos).

Los datos anteriores demuestran que una vez que se han generado de forma sistémica ("sensibilización") linfocitos T CD8 específicos de antígeno, la administración local de un agonista de TLR4 en el sitio del tumor "atraía" estos linfocitos T CD8 al tumor, lo que media la inmunidad protectora contra el crecimiento tumoral. Estos datos apoyan el uso de "sensibilización-atracción" como estrategia de vacuna prometedor para inmunoterapia del cáncer.

Ejemplo 4: Investigación de la cinética de la estrategia de sensibilización-atracción.

Actualmente está en curso un estudio para investigar la cinética de la estrategia de sensibilización-atracción. En este estudio, en el día 0, se inocularon ratones C57BL/6 (n=5 por grupo) con 1×10^5 células B16OVA, por vía subcutánea en el lomo derecho. Cuando los tumores medían $> 4 \text{ mm}^2$ (día 7), los ratones se inmunizaron una vez con VP02/OVA o control de vehículo en la ase de la cola. La administración intratumoral de 5 µg de GLA/SE al 2 % en solitario se empezó cuando los tumores medían $> 4 \text{ mm}^2$ (día 7) o en el día 21 y siguió cada 3-4 días después de ellos hasta el final del estudio. En el día 22, 23 y 24, se recogieron esplenocitos y tumores para determinar el punto

temporal (1, 2 o 3 días después de la última administración de GLA/SE) que tenía el porcentaje más alto de linfocitos de infiltración tumoral.

Ejemplo 5: Determinación del fenotipo de linfocitos de infiltración tumoral que provoca la atracción de GLA, en comparación con linfocitos de infiltración tumoral en la medida inicial.

5 Métodos: Los ratones se inoculan con células tumorales. Los ratones que albergan tumor entonces se inmunizan con VP02/A mediante administración en la base de la cola, seguido de administración intratumoral de GLA. Los tumores se recogen y analizan para fenotipado de linfocitos de infiltración tumoral mediante citometría de flujo y análisis después de la administración de GLA. El fenotipado de marcadores se hace en células positivas a pentámero mientras que se usa reestimulación peptídica para evaluar la multipotencia y fenotipo de equilibrio de respuesta.

10 Ejemplo 6: Determinación de si la atracción de GLA es específica para linfocitos T CD8 específicos de antígeno.

15 Métodos: Se transfieren de forma adoptiva esplenocitos marcados de CFSE de ratones no inmunizados o inmunizados con VP02/OVA en ratones sin tratar previamente inoculados con tumor B16/OVA, seguido de administración intratumoral de GLA. Los tumores se recogen y analizan para linfocitos de infiltración tumoral específicos de antígeno A mediante citometría de flujo después de administración de GLA. Para aumentar la señal y estudiar el efecto de atracción en linfocitos CD8 y CD4, se inmunizan ratones OT-I (CD8) u OT-II (CD4) y se usan como donadores en el experimento de transferencia adoptiva.

Ejemplo 7: Evaluación de si la atracción de GLA es dependiente de antígeno.

20 Métodos: Se inoculan ratones con células tumorales (que expresan o que no expresan antígeno A). Los ratones que albergan tumor entonces se inmunizarán con VP02/A (que contiene antígeno A) mediante administración en la base de la cola. A los ratones inmunizados entonces se les da una administración intratumoral de GLA. Los tumores se recogen y analizan para linfocitos de infiltración tumoral específicos de antígeno A mediante citometría de flujo después de administración de GLA.

Ejemplo 8: Control de la magnitud y cinética de la atracción de GLA.

25 Métodos: Los ratones OT-I-luc son ratones transgénicos que tienen linfocitos T CD8 específicos de OVA que emitirán luminiscencia en presencia de luciferasa. Estos ratones, por lo tanto, no tienen que inmunizarse con VP02/OVA para generar linfocitos T CD8 específicos de OVA, sin embargo, la inmunización en general es necesaria para activar los linfocitos T. Los ratones se inoculan con células tumorales, seguido de inmunización con VP02/OVA y después se le da una administración intratumoral de GLA. Un grupo de control del estudio se sensibiliza de forma simulada con VP02/IrrAg. Los ratones se inoculan con células tumorales, seguido de administración intratumoral de GLA. Se toman imágenes de los animales que albergan tumor con el sistema IVIS para evaluar la señal bioluminiscente dentro del tumor. Como únicamente las células T CD8 OT-I-luc tienen propiedades de bioluminiscencia, la magnitud de la señal se correlaciona directamente con el umero de linfocitos T CD8 específicos de OVA en el tumor. Para estudios de cinética, la inoculación del tumor es opcional.

35 Ejemplo 9: Investigación de la diversidad del repertorio de receptores de linfocitos T de la sensibilización-atracción, en comparación con "sensibilización" únicamente, "atracción" únicamente o ratones no tratados

40 Métodos: Los ratones se inoculan con células tumorales. Los ratones que albergan tumor entonces (1) se inmunizan con VP02/A mediante administración en la base de la cola, seguido de administración intratumoral de GLA, o (2) se inmunizan únicamente con VP02/A, o (3) se tratan únicamente por inyección intratumoral de GLA o (4) se dejan sin tratar. Los tumores y los bazos se recogen y se analizan por análisis de receptores de linfocitos T de linfocitos de infiltración tumoral y esplenocitos mediante secuenciación profunda. Se prevé que los ratones tratados con sensibilización-atracción muestren la máxima diversidad clonal tanto en linfocitos esplénicos como TIL.

Ejemplos de aspectos

1. Un método de tratamiento de un cáncer, que comprende:

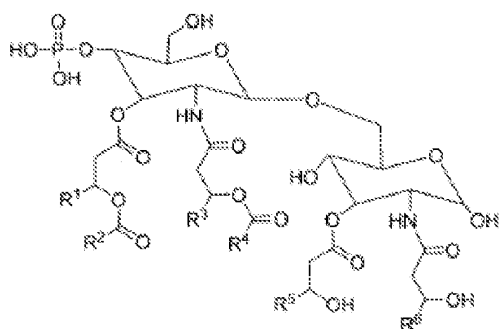
45 a) administrar a un sujeto una primera composición que comprende una partícula de vector vírico, comprendiendo la partícula de vector vírico un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a cáncer, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado a cáncer en el sujeto; y

50 b) administrar de forma local al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado, en el que la composición no comprende antígeno;

en el que la primera composición y la segunda composición comprenden cada una además un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente.

2. El método de la realización 1, en el que el cáncer es un cáncer inducido por virus oncógeno.
3. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el antígeno asociado a cáncer es un antígeno derivado del virus oncógeno.
- 5 4. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la primera composición se administra de forma sistémica mediante una primera vía y la segunda composición se administra de forma local mediante una segunda vía.
5. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que la primera vía es intramuscular, intradérmica o subcutánea y la segunda vía es intratumoral, intranodal, a la mucosa o intravesical.
- 10 6. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el adyuvante farmacéuticamente adecuado es un agonista de TLR4.
7. El método de la realización 6, en el que el agonista de TLR4 es un adyuvante relacionado con lípido A atóxico.
8. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el adyuvante relacionado con lípido A atóxico es glucopiranosil lípido A (GLA).
- 15 9. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que GLA se formula en una emulsión de aceite en agua adecuada.
10. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el GLA tiene la fórmula:

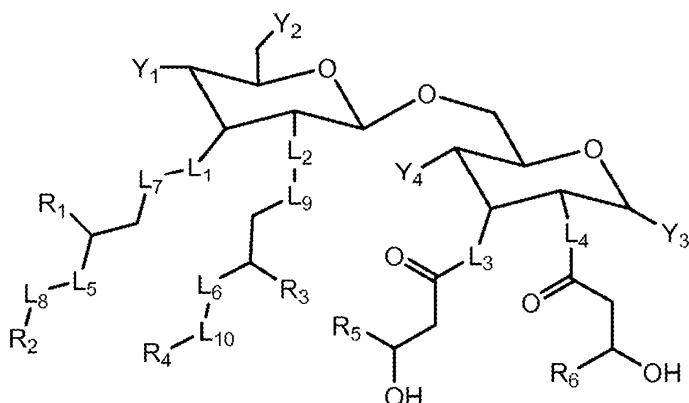
(I)



donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀.

11. El método de la realización 10, en el que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.
- 20 12. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que GLA tiene la fórmula:

(II)



- 25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que: L1, L2, L3, L4, L5 y L6 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -O-, -NH- y -(CH₂)-; L7, L8, L9 y L10 son iguales o diferentes, y cada vez que aparecen pueden estar ausentes o ser -C(=O)-; Y1 es un grupo funcional ácido; Y2 y Y3 son iguales o diferentes y se selecciona cada uno independientemente de -OH-, -SH y un grupo funcional ácido; Y4 es -OH o -SH; R1, R3, R5 y R6 son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente de grupo de alquilo C₈-C₁₃; y R2 y R4

son iguales o diferentes o se seleccionan cada uno independientemente del grupo de alquilo C6-C11.

13. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la primera composición se administra antes de la administración de la segunda composición.

5 14. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la primera composición y/o la segunda composición se administra 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces.

15. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el vector de expresión recombinante se selecciona de un genoma de vector retroviral, un genoma de vector lentiviral, un genoma de vector poxviral, un genoma de vector de virus vaccinia, genoma de vector adenoviral, genoma de vector de virus adenoasociado, genoma de vector herpesviral, genoma de vector de alfavirus, ADN y ARN plasmídico.

10 16. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la partícula de vector vírico es una partícula de vector lentiviral que comprende el genoma de vector lentiviral; una partícula de vector poxviral que comprende el genoma de vector poxviral; una partícula de vector de virus vaccinia que comprende el genoma de vector de virus vaccinia; una partícula de vector adenoviral que comprende el genoma de vector adenoviral; una partícula de vector de virus adenoasociado que comprende el genoma de vector de virus adenoasociado; una partícula de vector herpesviral que comprende el genoma de vector herpesviral; o una partícula de vector de alfavirus que comprende el genoma de vector de alfavirus.

17. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la partícula de vector vírico es la partícula de vector lentiviral y comprende el genoma de vector lentiviral.

20 18. El método de realizaciones previas, en el que la partícula de vector lentiviral comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 1, en el que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico y en el que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis.

19. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la partícula de vector vírico suministra el vector de expresión recombinante a una célula dendrítica.

25 20. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el antígeno asociado a cáncer se selecciona de p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, cinasas dependientes de ciclina, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPEmbcr-abl, BCR-ABE, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , transductor 1 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, tirosina cinasas receptoras, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), tirosina cinasas citoplásmicas, familia src, syk-ZAP70, cinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6, factores inducibles por hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α , factor nuclear Kappa B (NF- κ B), receptores Notch, Notch1-4, c-Met, dianas de mamífero de rapamicina (mTOR), WNT, cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, 5T4 de carcinoma de células renales, SM22-alfa, anhídrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de corte de traslocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión de ETS de TMPRSS2), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, poli(ácido siálico), MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboh, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSSX2, XAGE 1, B7H3, legumina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, y antígeno 1
45 relacionado con fos.

21. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el antígeno asociado a cáncer se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A y antígeno T de BK.

22. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el cáncer es cáncer de vejiga.

50 23. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado comprende además BCG.

55 24. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la segunda composición se administra en combinación con una composición que comprende uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor del punto de control (por ejemplo, anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA4 y similares), una citocina, cloroquina, un anticuerpo que aumenta ADCC, un anticuerpo que promueve una señal coestimuladora o un anticuerpo anti-CD40.

25. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la primera composición comprende además un adyuvante.

26. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, que comprende además administrar una composición de refuerzo que comprende un adyuvante en combinación con un polipéptido, en el que el polipéptido comprende el antígeno asociado a cáncer, o un fragmento inmunógeno del mismo.

27. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la respuesta inmunitaria inducida comprende una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos.

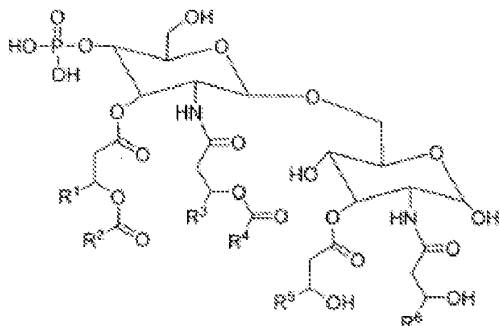
28. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la administración local de la segunda composición induce un aumento en linfocitos T CD8+ en el sitio local de administración.

29. Un kit que comprende una primera composición y una segunda composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes.

30. Un método de tratamiento del cáncer, que comprende:

a) inducir una respuesta inmunitaria específica para un inmunógeno asociado con el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una primera composición que comprende una partícula de vector lentivírico, comprendiendo la partícula de vector lentivírico un vector de expresión recombinante, en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica el inmunógeno, en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, en el que la partícula de vector lentivírico comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en el que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, y en el que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis; y

b) administrar por vía intratumoral una segunda composición que comprende una adyuvante farmacéuticamente adecuado, en el que la segunda composición no comprende un inmunógeno, y en el que el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A atóxico que es glucopiranosil lípido A (GLA) formulado en una emulsión de agua en aceite estable, en el que GLA tiene la fórmula:



donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo;

en el que el inmunógeno asociado con el cáncer se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A;

en el que la primera composición y la segunda composición comprenden cada una además un excipiente farmacéuticamente adecuado, en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente, en el que la primera composición se administra por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea.

31. Un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto, que comprende:

a) administrar al sujeto una primera composición que comprende

i. linfocitos T específicos de antígeno específicos para un antígeno asociado a cáncer, habiéndose expandido dichos linfocitos T específicos de antígeno *ex vivo*,

ii. linfocitos T que se han modificado genéticamente para que expresen un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce el antígeno asociado a cáncer, o

iii. linfocitos T que se han modificado genéticamente para que expresen un receptor de linfocitos T (TCR) quimérico específico que reconoce el antígeno asociado a cáncer en el contexto de MHC; y

b) administrar por vía intratumoral al sujeto una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado, en el que la segunda composición no comprende antígeno; u opcionalmente comprende un antígeno, tal como un antígeno asociado a cáncer enumerado en cualquiera de las realizaciones precedentes;

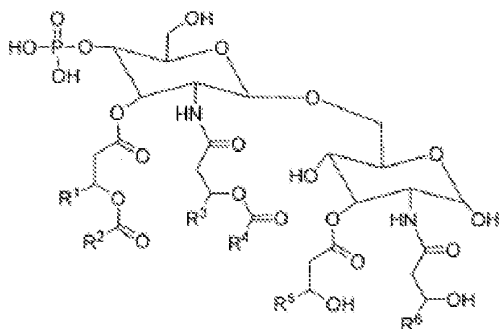
5 en el que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente.

32. El método de la realización 31, en el que el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A atóxico.

33. El método de la realización 31, en el que el adyuvante es glucopiranosil lípido A (GLA).

10 34. El método de la realización 33, en el que GLA se formula en una emulsión de aceite en agua adecuada.

35. El método de la realización 33 o realización 34, en el que el GLA tiene la fórmula:



donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀.

36. El método de la realización 35, en el que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.

15 37. Una composición que comprende

a) una primera composición que comprende una partícula de vector vírico, comprendiendo la partícula de vector vírico un vector de expresión recombinante en la que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a cáncer, y en la que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión regulador, induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado a cáncer en el sujeto; y

20 b) una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado; en la que la segunda composición no comprende antígeno;

en la que la primera composición y la segunda composición comprenden además cada una un excipiente farmacéuticamente adecuado, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en la que la primera composición se administra de forma sistémica al sujeto; y en la que la segunda composición se administra de forma local al sujeto; y en la que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente.

25 38. La composición de la realización 37, en la que cáncer es un cáncer inducido por virus oncógeno.

30 39. La composición de la realización 38, en la que el antígeno asociado a cáncer es un antígeno derivado del virus oncógeno.

40. La composición de la realización 37, en la que la primera composición se administra de forma sistémica mediante una primera vía y la segunda composición se administra de forma local mediante una segunda vía.

41. La composición de la realización 40, en la que la primera vía es intramuscular, intradérmica o subcutánea y la segunda vía es intratumoral, intranodal, a la mucosa o intravesical.

35 42. La composición de la realización 37, en la que el adyuvante farmacéuticamente adecuado es un agonista de TLR4.

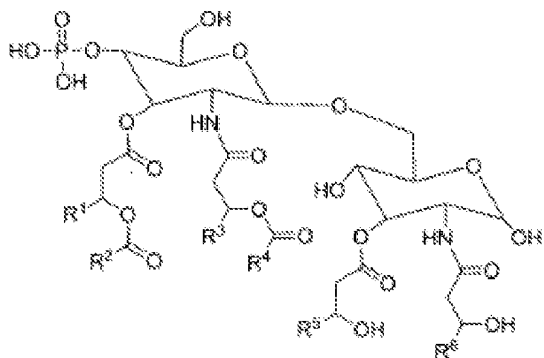
43. La composición de la realización 42, en la que el agonista de TLR4 es un adyuvante relacionado con lípido A atóxico.

40 44. La composición de la realización 43, en la que el adyuvante relacionado con lípido A atóxico es glucopiranosil lípido A (GLA).

45. La composición de la realización 44, en la que GLA se formula en una emulsión de aceite en agua estable.

46. La composición de una cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el GLA tiene la fórmula:

(I)

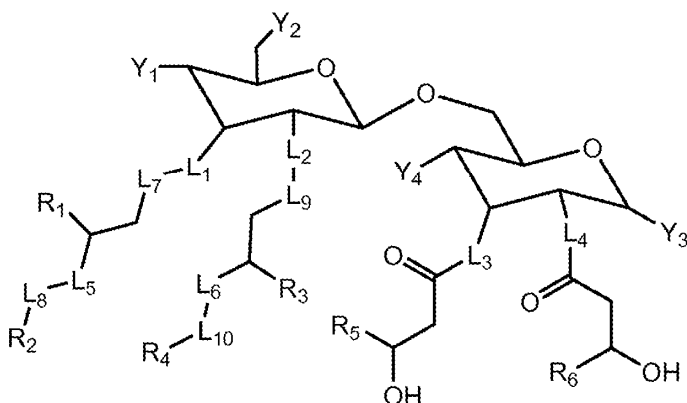


donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀.

5 47. La composición de la realización 46, en la que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.

48. La composición de una cualquiera de las realizaciones 44-45, en la que el GLA tiene la fórmula:

(II)



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que: L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ y L₆ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -O-, -NH- y -(CH₂)-; L₇, L₈, L₉ y L₁₀ son iguales o diferentes, y cada vez que aparecen pueden estar ausentes o ser -C(=O)-; Y₁ es un grupo funcional ácido; Y₂ e Y₃ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente de -OH-, -SH y un grupo funcional ácido; Y₄ es -OH o -SH; R₁, R₃, R₅ y R₆ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente del grupo de alquilo C₈-C₁₃; y R₂ y R₄ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente del grupo de alquilo C₆-C₁₁.

10

15 49. La composición de una cualquiera de las realizaciones 37-45, en la que la primera composición se administra antes de la administración de la segunda composición.

50. La composición de una cualquiera de las realizaciones 37-45, en la que la primera composición y/o la segunda composición se administran 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces.

20 51. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que el vector de expresión recombinante se selecciona de un genoma de vector retrovítico, un genoma de vector lentivítico, genoma de vector poxvítico, genoma de vector de virus vaccinia, genoma de vector adenovítico, genoma de vector de virus adenoasociado, genoma de vector herpesvítico, genoma de vector de alfavirus, ADN y ARN plasmídico.

25 52. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la partícula de vector vírico es una partícula de vector lentivítico que comprende el genoma de vector lentivítico; una partícula de vector poxvítico que comprende el genoma de vector poxvítico; una partícula de vector de virus vaccinia que comprende el genoma de vector de virus vaccinia; una partícula de vector adenovítico que comprende el genoma de vector adenovítico; una partícula de vector de virus adenoasociado que comprende el genoma de vector de virus adenoasociado; una partícula de vector herpesvítico que comprende el genoma de vector herpesvítico; o una partícula de vector de

alfavirus que comprende el genoma de vector de alfavirus.

53. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la partícula de vector vírico es la partícula de vector lentivírico y comprende el genoma de vector lentivírico.

5 54. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que partícula de vector lentivírico comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, y en la que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis.

10 55. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la partícula de vector vírico suministra el vector de expresión recombinante a una célula dendrítica.

56. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que el antígeno asociado a cáncer se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A, antígeno T de BK, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, cinasas dependientes de ciclina, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, 15 MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, 20 TPEmbcr-abl, BCR-ABE, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , transductor 1 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, tirosina cinasas receptoras, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), tirosina cinasas citoplásmicas, familia src, syk-ZAP70, cinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6, factores inducibles por hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α , factor nuclear Kappa B (NF- κ B), receptores 25 Notch, Notch1-4, c-Met, dianas de mamífero de rapamicina (mTOR), WNT, cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, 5T4 de carcinoma de células renales, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de corte de traslocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión de ETS de TMPRSS2), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, poli(ácido siálico), MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, 30 GLoboH, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SXX2, XAGE 1, B7H3, legumafina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, y antígeno 1 relacionado con fos.

58. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que el cáncer es cáncer de vejiga.

35 59. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado comprende además BCG.

60. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la segunda composición se administra en combinación con una composición que comprende un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor del punto de control, una citocina, cloroquina, un anticuerpo que aumenta ADCC, un anticuerpo que promueve una señal coestimuladora, un anticuerpo anti-CD40.

40 61. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la primera composición comprende además un adyuvante.

62. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, que comprende además administrar una composición de refuerzo que comprende un adyuvante en combinación con un polipéptido, en la que el polipéptido comprende el antígeno asociado a cáncer o un fragmento inmunógeno del mismo.

45 63. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la respuesta inmunitaria inducida comprende una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos.

64. La composición de una cualquiera de las realizaciones previas, en la que la administración local de la segunda composición induce un aumento en los linfocitos T CD8+ en el sitio local de administración.

50 65. Un kit que comprende una primera composición y una segunda composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones previas.

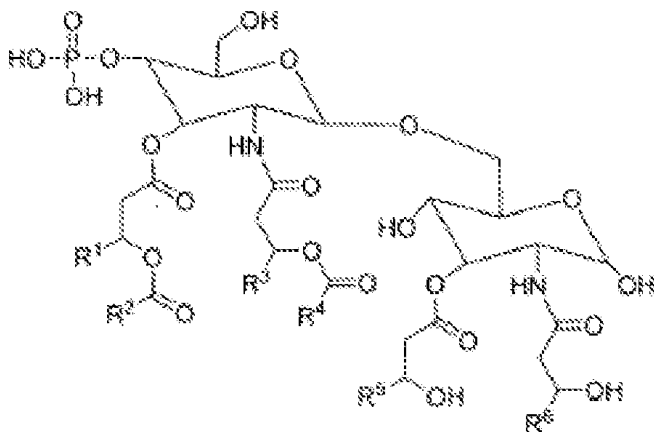
66. Una composición que comprende:

a) una primera composición que comprende una partícula de vector lentivírico, comprendiendo la partícula de vector lentivírico un vector de expresión recombinante, en la que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un inmunógeno asociado con cáncer, en la que el polipéptido está unido de forma

funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, en la que la partícula de vector lentivirico comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en la que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, y en la que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis; y

5

b) una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado, en la que la segunda composición no comprende un inmunógeno; en la que el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A atóxico que es glucopiranosil lípido A (GLA) formulado en una emulsión de aceite en agua estable, en la que el GLA tiene la fórmula:



10

donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo;

en la que el inmunógeno asociado con cáncer se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A;

15

en la que primera composición y la segunda composición comprenden cada una además un excipiente farmacéuticamente adecuado, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto, en la que primera composición se administra por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea e induce una respuesta inmunitaria específica para el inmunógeno asociado con el cáncer en el sujeto; en el que la segunda composición se administra por vía intratumoral; y en la que la primera composición y en la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente.

20

67. Una composición que comprende:

a) una primera composición que comprende

i. linfocitos T específicos de antígeno autólogos o heterólogos específicos para un antígeno asociado a cáncer, habiéndose expandido dichos linfocitos T específicos de antígeno *ex vivo*,

25

ii. linfocitos T autólogos o heterólogos que se han modificado genéticamente para que expresen un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce el antígeno asociado a cáncer, o

iii. linfocitos T que se han modificado genéticamente para que expresen un receptor de linfocitos T (TCR) quimérico específico que reconoce el antígeno asociado a cáncer en el contexto de MHC; y

30

b) una segunda composición que comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado; en la que la segunda composición no comprende un inmunógeno;

en la que la primera composición y la segunda composición comprenden cada una además un excipiente farmacéuticamente adecuado;

para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto, en la que la primera composición se administra de forma sistémica al sujeto; y la segunda composición se administra por vía intratumoral y en la que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente.

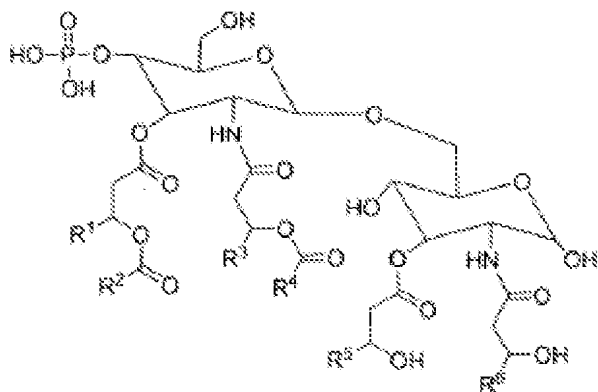
35

68. El método de una cualquiera las realizaciones previas, en el que el adyuvante es un adyuvante relacionado con lípido A atóxico.

69. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el adyuvante es glucopiranosil lípido A (GLA).

70. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que GLA se formula en una emulsión de aceite en agua estable.

71. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que el GLA tiene la fórmula:



5 donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀.

72. El método de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.

73. Un método de aumento de linfocitos T en el microentorno tumoral, que comprende,

10 a) administrar a un sujeto que tiene un tumor una primera composición que comprende una partícula de vector, comprendiendo la partícula de vector un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a cáncer, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado a cáncer en el sujeto; y

15 b) administrar por vía intratumoral o peritumoral al sujeto una segunda composición que comprende un agonista de TLR4, en el que la composición no comprende antígeno;

en el que la primera composición y la segunda composición comprenden cada una además un excipiente farmacéuticamente adecuado, y en el que la primera composición y la segunda composición se administran simultánea o secuencialmente;

aumentando de ese modo los linfocitos T en el microentorno tumoral.

20

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> IMMUNE DESIGN CORP
- 5 <120> INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER A TRAVÉS DE COMBINACIÓN DE INMUNOESTIMULACIÓN LOCAL Y SISTÉMICA.
- <130> 31943/48357
- 10 <150> US-61/940,109
<151> 14-02-2014
- <150> US-61/985,787
<151> 29-04-2014
- 15 <150> US-62/022,070
<151> 08-07-2014
- <150> US-62/072,548
<151> 30-10-2014
- 20 <150> US-62/101,335
<151> 08-01-2015
- <160> 45
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 423
<212> PRT
30 <213> Sindbis virus
- <220>
<221> característica miscelánea
<222> (160) .. (160)
35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 1
Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15
- Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30
- Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45
- Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60
- Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr Met
65 70 75 80
- Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

ES 2 738 582 T3

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
 115 120 125
 Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
 130 135 140
 Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Xaa
 145 150 155 160
 Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
 180 185 190
 Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
 195 200 205
 Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
 210 215 220
 Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
 225 230 235 240
 Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
 245 250 255
 Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 260 265 270
 Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 275 280 285
 Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 290 295 300
 Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 305 310 315 320
 Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 325 330 335
 Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro

ES 2 738 582 T3

340 345 350

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
370 375 380

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 2
<211> 986
<212> PRT
<213> Sindbis virus

5

<400> 2
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Ser Val Ile
50 55 60

Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Tyr Cys
65 70 75 80

His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu Gln Val Trp
85 90 95

Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser Ala Gln Phe
100 105 110

Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr Arg Tyr Met
115 120 125

Ser Leu Lys Gln Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Thr Val

10

ES 2 738 582 T3

Val Arg Asn Phe Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly
 385 390 395 400

Asn His Glu Pro Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp
 405 410 415

Pro His Gly Trp Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His
 420 425 430

Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met
 435 440 445

Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu
 450 455 460

Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser
 465 470 475 480

Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 485 490 495

Glu Thr Met Ser Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val
 500 505 510

Gln Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys
 515 520 525

Ser Cys Cys Leu Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys
 530 535 540

Val Asp Ala Tyr Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile
 545 550 555 560

Pro Tyr Lys Ala Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu
 565 570 575

Glu Ile Thr Val Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu
 580 585 590

Tyr Ile Thr Cys Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys
 595 600 605

Cys Cys Gly Ser Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Gly Tyr Thr
 610 615 620

Cys Lys Val Phe Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln
 625 630 635 640

ES 2 738 582 T3

Cys Phe Cys Asp Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu
 645 650 655
 Leu Ser Ala Asp Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His
 660 665 670
 Thr Ala Ala Met Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr
 675 680 685
 Ser Phe Leu Asp Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys
 690 695 700
 Asp Leu Lys Val Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe
 705 710 715 720
 Asp His Lys Val Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe
 725 730 735
 Pro Glu Tyr Gly Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala
 740 745 750
 Thr Ser Leu Thr Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu
 755 760 765
 Leu Lys Pro Ser Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser
 770 775 780
 Ser Gly Phe Glu Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu
 785 790 795 800
 Thr Ala Pro Phe Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val
 805 810 815
 Asp Cys Ser Tyr Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala
 820 825 830
 Ala Phe Ile Arg Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys
 835 840 845
 Glu Val Ser Glu Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr
 850 855 860
 Leu Gln Tyr Val Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His
 865 870 875 880
 Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys
 885 890 895

ES 2 738 582 T3

Gly Ala Val Thr Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe
 900 905 910

Ile Val Ser Leu Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys
 915 920 925

Pro Pro Ala Asp His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu
 930 935 940

Phe Gln Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu
 945 950 955 960

Phe Gly Gly Ala Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala
 965 970 975

Cys Ser Met Met Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980 985

<210> 3
 <211> 982
 5 <212> PRT
 <213> Sindbis virus

<400> 3
 Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

10

ES 2 738 582 T3

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
 210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe

ES 2 738 582 T3

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
 755 760 765
 Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
 770 775 780
 Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
 805 810 815
 Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
 820 825 830
 Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
 835 840 845
 Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
 850 855 860
 Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
 865 870 875 880

ES 2 738 582 T3

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 4
<211> 982
5 <212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 4
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

10

ES 2 738 582 T3

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
 210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365

ES 2 738 582 T3

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe

ES 2 738 582 T3

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 5
<211> 980
5 <212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 5
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

10

ES 2 738 582 T3

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Thr
 210 215 220

Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr
 225 230 235 240

Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser
 245 250 255

Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly
 260 265 270

Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln
 275 280 285

Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro
 290 295 300

Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu
 305 310 315 320

Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala
 325 330 335

Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr
 340 345 350

ES 2 738 582 T3

Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu
 355 360 365

Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val
 370 375 380

Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg
 385 390 395 400

Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His
 405 410 415

Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu
 420 425 430

Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala
 435 440 445

Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala
 450 455 460

Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys
 465 470 475 480

Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr Leu
 485 490 495

Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro Leu
 500 505 510

Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro Phe
 515 520 525

Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu His
 530 535 540

Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu Val
 545 550 555 560

Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met Ser
 565 570 575

Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys Phe
 580 585 590

Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu Glu
 595 600 605

ES 2 738 582 T3

Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly Gly
 610 615 620
 Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser Glu
 625 630 635 640
 Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys Ala
 645 650 655
 Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys Val
 660 665 670
 Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val Tyr
 675 680 685
 Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile Ala
 690 695 700
 Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val Ile
 705 710 715 720
 His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Met
 725 730 735
 Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser Lys
 740 745 750
 Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala Lys
 755 760 765
 Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met Trp
 770 775 780
 Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly Cys
 785 790 795 800
 Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly Asn
 805 810 815
 Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr Ser
 820 825 830
 Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys Thr
 835 840 845
 Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser Asp

ES 2 738 582 T3

850 855 860

Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr Leu
865 870 875 880

Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val His
885 890 895

Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys Gly
900 905 910

Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His Ile
915 920 925

Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile Ser
930 935 940

Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser Ser
945 950 955 960

Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu Thr
965 970 975

Ser Thr Arg Arg
980

<210> 6
<211> 981
5 <212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 6
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile

10

ES 2 738 582 T3

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
 485 490 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
 515 520 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
 530 535 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
 565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
 580 585 590

ES 2 738 582 T3

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
 595 600 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
 610 615 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
 625 630 635 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
 645 650 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
 660 665 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
 675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
 690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
 705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
 725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
 740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
 755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
 770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
 785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
 805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
 820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
 835 840 845

ES 2 738 582 T3

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 7

<211> 982

5 <212> PRT

<213> Sindbis virus

<400> 7

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

10

ES 2 738 582 T3

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

ES 2 738 582 T3

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
580 585 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
595 600 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
610 615 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625 630 635 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
645 650 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
660 665 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
675 680 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
690 695 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

ES 2 738 582 T3

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 8

<211> 981

5 <212> PRT

<213> Sindbis virus

<400> 8

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

10

ES 2 738 582 T3

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

ES 2 738 582 T3

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 325 330 335
 Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365
 Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380
 Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400
 Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415
 His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430
 Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445
 Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460
 Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 465 470 475 480
 Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
 485 490 495
 Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510
 Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
 515 520 525
 Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
 530 535 540
 His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560
 Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met

ES 2 738 582 T3

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 9
<211> 982
5 <212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 9
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

10

ES 2 738 582 T3

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
 210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300

ES 2 738 582 T3

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
485 490 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
515 520 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
530 535 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545 550 555 560

ES 2 738 582 T3

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
 755 760 765
 Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
 770 775 780
 Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr

ES 2 738 582 T3

805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 10
<211> 981
5 <212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 10
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp

10

ES 2 738 582 T3

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
 290 295 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
 305 310 315 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 325 330 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
 485 490 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
 515 520 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
 530 535 540

ES 2 738 582 T3

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
 565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
 580 585 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
 595 600 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
 610 615 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
 625 630 635 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
 645 650 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
 660 665 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
 675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
 690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
 705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
 725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
 740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
 755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
 770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
 785 790 795 800

ES 2 738 582 T3

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 11
<211> 982
<212> PRT
<213> Sindbis virus

5

<400> 11
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

10

ES 2 738 582 T3

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

ES 2 738 582 T3

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
530 535 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545 550 555 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
565 570 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
580 585 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
595 600 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
610 615 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625 630 635 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
645 650 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
660 665 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
675 680 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
690 695 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

ES 2 738 582 T3

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 12
<211> 981
5 <212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 12
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

10

ES 2 738 582 T3

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 225 230 235 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
 245 250 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
 260 265 270

ES 2 738 582 T3

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
 275 280 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
 290 295 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
 305 310 315 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 325 330 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
 485 490 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro

ES 2 738 582 T3

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 13
<211> 982
<212> PRT
<213> Sindbis virus

5

<400> 13

ES 2 738 582 T3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255

ES 2 738 582 T3

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510

ES 2 738 582 T3

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
515 520 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
530 535 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545 550 555 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
565 570 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
580 585 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
595 600 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
610 615 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625 630 635 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
645 650 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
660 665 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
675 680 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
690 695 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser

ES 2 738 582 T3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 225 230 235 240

ES 2 738 582 T3

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
 245 250 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
 260 265 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
 275 280 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
 290 295 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
 305 310 315 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 325 330 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
 485 490 495

ES 2 738 582 T3

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
 515 520 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
 530 535 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
 565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
 580 585 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
 595 600 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
 610 615 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
 625 630 635 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
 645 650 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
 660 665 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
 675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
 690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
 705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
 725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
 740 745 750

ES 2 738 582 T3

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 15

<211> 982

5 <212> PRT

<213> Sindbis virus

<400> 15

ES 2 738 582 T3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala

ES 2 738 582 T3

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525
 Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540
 Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735

ES 2 738 582 T3

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

- <210> 16
- <211> 981
- <212> PRT
- <213> Sindbis virus

5

<400> 16

ES 2 738 582 T3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

ES 2 738 582 T3

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 225 230 235 240
 Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
 245 250 255
 Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
 275 280 285
 Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
 290 295 300
 Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
 305 310 315 320
 Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 325 330 335
 Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365
 Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380
 Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400
 Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415
 His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430
 Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445
 Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460
 Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys

ES 2 738 582 T3

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

5 <210> 17
<211> 982
<212> PRT
<213> Sindbis virus

10 <400> 17

ES 2 738 582 T3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

ES 2 738 582 T3

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460

ES 2 738 582 T3

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525
 Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540
 Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val

ES 2 738 582 T3

000

<210> 19

5 <400> 19
000

<210> 20

<211> 488

10 <212> PRT

<213> Sindbis virus

<400> 20

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

15

ES 2 738 582 T3

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

ES 2 738 582 T3

	405		410		415										
Pro	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr
			420					425					430		
Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr
		435					440					445			
Val	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro
	450					455					460				
Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu
465					470					475					480
Cys	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala								
				485											

<210> 21
 <211> 683
 <212> ADN
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.

5

<400> 21
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatata cttgatctgt ggatctacca 240
 cacacaaggg tacttccctg attggcagaa ctacacacca gggccagga tcagatatcc 300
 actgaccttt ggatgggtgct acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360
 caatgaagga gagaacaccc gcttggtaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgacct 420
 ggagagagaa gtattagagt ggaggtttga cagccgccta gcatttcata acatggcccc 480
 agagctgcat ccggactgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct 540
 ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgccctt gactgcttca 600
 agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta 660
 gtcagtgtgg aaaatctcta gca 683

10

<210> 22
 <211> 416
 <212> ADN
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.

15

<400> 22
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

ES 2 738 582 T3

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180
actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgcct gtactgggtc 240
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

<210> 23
<211> 401
5 <212> ADN
<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.

<400> 23
cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
ctggctagaa gcacaagagg aggaggagg gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggctaat 180
tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggctctctt ggtagacca 240
gatctgagcc tgggagctct ctggctaact aggaacca ctgcttaagc ctcaataaag 300
cttgccctga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360
atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401

10 <210> 24

<400> 24
000

15 <210> 25

<400> 25
000

20 <210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Sindbis virus

25 <400> 26
Arg Ser Lys Arg Ser
1 5

30 <210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Sindbis virus

<400> 27
Arg Ser Lys Arg
35 1

<210> 28

<400> 28
40 000

<210> 29

<400> 29
45 000

ES 2 738 582 T3

<210> 30
 <400> 30
 000
 5 <210> 31
 <400> 31
 000
 10 <210> 32
 <400> 32
 000
 15 <210> 33
 <400> 33
 000
 20 <210> 34
 <400> 34
 000
 25 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> una secuencia de péptido de marca
 <400> 35
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 35 1 5
 <210> 36
 <211> 1374
 <212> PRT
 40 <213> Herpesvirus humano 2
 <400> 36
 Met Ala Ala Pro Ala Arg Asp Pro Pro Gly Tyr Arg Tyr Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ile Leu Pro Thr Gly Ser Ile Leu Ser Thr Ile Glu Val Ala Ser His

ES 2 738 582 T3

Pro Val Asp Gly Val Leu Val Thr Thr Ala Ala Ile Lys Gln Arg Leu
 275 280 285

Leu Gln Ser Phe Leu Lys Val Glu Asp Thr Glu Ala Asp Val Pro Val
 290 295 300

Thr Tyr Gly Glu Met Val Leu Asn Gly Ala Asn Leu Val Thr Ala Leu
 305 310 315 320

Val Met Gly Lys Ala Val Arg Ser Leu Asp Asp Val Gly Arg His Leu
 325 330 335

Leu Asp Met Gln Glu Glu Gln Leu Glu Ala Asn Arg Glu Thr Leu Asp
 340 345 350

Glu Leu Glu Ser Ala Pro Gln Thr Thr Arg Val Arg Ala Asp Leu Val
 355 360 365

Ala Ile Gly Asp Arg Leu Val Phe Leu Glu Ala Leu Glu Arg Arg Ile
 370 375 380

Tyr Ala Ala Thr Asn Val Pro Tyr Pro Leu Val Gly Ala Met Asp Leu
 385 390 395 400

Thr Phe Val Leu Pro Leu Gly Leu Phe Asn Pro Ala Met Glu Arg Phe
 405 410 415

Ala Ala His Ala Gly Asp Leu Val Pro Ala Pro Gly His Pro Glu Pro
 420 425 430

Arg Ala Phe Pro Pro Arg Gln Leu Phe Phe Trp Gly Lys Asp His Gln
 435 440 445

Val Leu Arg Leu Ser Met Glu Asn Ala Val Gly Thr Val Cys His Pro
 450 455 460

Ser Leu Met Asn Ile Asp Ala Ala Val Gly Gly Val Asn His Asp Pro
 465 470 475 480

Val Glu Ala Ala Asn Pro Tyr Gly Ala Tyr Val Ala Ala Pro Ala Gly
 485 490 495

Pro Gly Ala Asp Met Gln Gln Arg Phe Leu Asn Ala Trp Arg Gln Arg
 500 505 510

Leu Ala His Gly Arg Val Arg Trp Val Ala Glu Cys Gln Met Thr Ala
 515 520 525

ES 2 738 582 T3

Glu Gln Phe Met Gln Pro Asp Asn Ala Asn Leu Ala Leu Glu Leu His
 530 535 540

Pro Ala Phe Asp Phe Phe Ala Gly Val Ala Asp Val Glu Leu Pro Gly
 545 550 555 560

Gly Glu Val Pro Pro Ala Gly Pro Gly Ala Ile Gln Ala Thr Trp Arg
 565 570 575

Val Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ala Leu Cys Pro Val Ala Phe Arg
 580 585 590

Asp Ala Arg Gly Leu Glu Leu Gly Val Gly Arg His Ala Met Ala Pro
 595 600 605

Ala Thr Ile Ala Ala Val Arg Gly Ala Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Pro
 610 615 620

Ala Val Phe Tyr Leu Leu Gln Ala Ala Ile His Gly Asn Glu His Val
 625 630 635 640

Phe Cys Ala Leu Ala Arg Leu Val Thr Gln Cys Ile Thr Ser Tyr Trp
 645 650 655

Asn Asn Thr Arg Cys Ala Ala Phe Val Asn Asp Tyr Ser Leu Val Ser
 660 665 670

Tyr Ile Val Thr Tyr Leu Gly Gly Asp Leu Pro Glu Glu Cys Met Ala
 675 680 685

Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala His Val Glu Ala Leu Ala Gln Leu Val
 690 695 700

Asp Asp Phe Thr Leu Pro Gly Pro Glu Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ala
 705 710 715 720

Glu Leu Asn His Leu Met Arg Asp Pro Ala Leu Leu Pro Pro Leu Val
 725 730 735

Trp Asp Cys Asp Gly Leu Met Arg His Ala Ala Leu Asp Arg His Arg
 740 745 750

Asp Cys Arg Ile Asp Ala Gly Gly His Glu Pro Val Tyr Ala Ala Ala
 755 760 765

Cys Asn Val Ala Thr Ala Asp Phe Asn Arg Asn Asp Gly Arg Leu Leu
 770 775 780

ES 2 738 582 T3

His Asn Thr Gln Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Asp Arg Pro His
 785 790 795 800

Arg Pro Ala Asp Trp Thr Val His His Lys Ile Tyr Tyr Tyr Val Leu
 805 810 815

Val Pro Ala Phe Ser Arg Gly Arg Cys Cys Thr Ala Gly Val Arg Phe
 820 825 830

Asp Arg Val Tyr Ala Thr Leu Gln Asn Met Val Val Pro Glu Ile Ala
 835 840 845

Pro Gly Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Val Thr Asp Pro Ala His Pro
 850 855 860

Leu His Pro Ala Asn Leu Val Ala Asn Thr Val Lys Arg Met Phe His
 865 870 875 880

Asn Gly Arg Val Val Val Asp Gly Pro Ala Met Leu Thr Leu Gln Val
 885 890 895

Leu Ala His Asn Met Ala Glu Arg Thr Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala
 900 905 910

Ala Pro Asp Ala Gly Ala Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asn Met Arg Ile
 915 920 925

Phe Asp Gly Ala Leu His Ala Gly Val Leu Leu Met Ala Pro Gln His
 930 935 940

Leu Asp His Thr Ile Gln Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Val Leu Pro Val
 945 950 955 960

His Ala Leu Phe Ala Gly Ala Asp His Val Ala Asn Ala Pro Asn Phe
 965 970 975

Pro Pro Ala Leu Arg Asp Leu Ala Arg Asp Val Pro Leu Val Pro Pro
 980 985 990

Ala Leu Gly Ala Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln
 995 1000 1005

His Ala Arg Glu Ser Ala Ala Gly Glu Asn Ala Leu Thr Tyr Ala
 1010 1015 1020

Leu Met Ala Gly Tyr Phe Lys Met Ser Pro Val Ala Leu Tyr His

ES 2 738 582 T3

1025		1030		1035
Gln Leu Lys Thr Gly Leu His Pro Gly Phe Gly Phe Thr Val Val 1040		1045		1050
Arg Gln Asp Arg Phe Val Thr Glu Asn Val Leu Phe Ser Glu Arg 1055		1060		1065
Ala Ser Glu Ala Tyr Phe Leu Gly Gln Leu Gln Val Ala Arg His 1070		1075		1080
Glu Thr Gly Gly Gly Val Asn Phe Thr Leu Thr Gln Pro Arg Gly 1085		1090		1095
Asn Val Asp Leu Gly Val Gly Tyr Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly 1100		1105		1110
Thr Val Arg Asn Pro Val Thr Asp Met Gly Asn Leu Pro Gln Asn 1115		1120		1125
Phe Tyr Leu Gly Arg Gly Ala Pro Pro Leu Leu Asp Asn Ala Ala 1130		1135		1140
Ala Val Tyr Leu Arg Asn Ala Val Val Ala Gly Asn Arg Leu Gly 1145		1150		1155
Pro Ala Gln Pro Leu Pro Val Phe Gly Cys Ala Gln Val Pro Arg 1160		1165		1170
Arg Ala Gly Met Asp His Gly Gln Asp Ala Val Cys Glu Phe Ile 1175		1180		1185
Ala Thr Pro Val Ala Thr Asp Ile Asn Tyr Phe Arg Arg Pro Cys 1190		1195		1200
Asn Pro Arg Gly Arg Ala Ala Gly Gly Val Tyr Ala Gly Asp Lys 1205		1210		1215
Glu Gly Asp Val Ile Ala Leu Met Tyr Asp His Gly Gln Ser Asp 1220		1225		1230
Pro Ala Arg Pro Phe Ala Ala Thr Ala Asn Pro Trp Ala Ser Gln 1235		1240		1245
Arg Phe Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Asn Gly Ala Tyr His Leu 1250		1255		1260

ES 2 738 582 T3

Asn Gly Ala Ser Pro Val Leu Ser Pro Cys Phe Lys Phe Phe Thr
 1265 1270 1275

Ala Ala Asp Ile Thr Ala Lys His Arg Cys Leu Glu Arg Leu Ile
 1280 1285 1290

Val Glu Thr Gly Ser Ala Val Ser Thr Ala Thr Ala Ala Ser Asp
 1295 1300 1305

Val Gln Phe Lys Arg Pro Pro Gly Cys Arg Glu Leu Val Glu Asp
 1310 1315 1320

Pro Cys Gly Leu Phe Gln Glu Ala Tyr Pro Ile Thr Cys Ala Ser
 1325 1330 1335

Asp Pro Ala Leu Leu Arg Ser Ala Arg Asp Gly Glu Ala His Ala
 1340 1345 1350

Arg Glu Thr His Phe Thr Gln Tyr Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Pro
 1355 1360 1365

Leu Lys Gly Leu Ser Leu
 1370

<210> 37

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Herpesvirus humano 2

<400> 37

Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln His Ala Arg
 1 5 10 15

10 <210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Herpesvirus humano 2

15 <400> 38

Cys Glu Phe Ile Ala Thr Pro Val Ala Thr Asp Ile Asn Tyr Phe
 1 5 10 15

20 <210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Herpesvirus humano 2

25 <400> 39

Glu Asn Ala Leu Thr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Tyr Phe Lys Met
 1 5 10 15

30 <210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Herpesvirus humano 2

35 <400> 40

His Pro Gly Phe Gly Phe Thr Val Val Arg Gln Asp Arg Phe Val
 1 5 10 15

<210> 41

<211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> una secuencia de péptido de marca

<400> 41
 Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

10 <210> 42
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 42
 Gly Pro Lys Glu Pro Phe Gln Ser Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln
 20 25 30

Thr Leu Leu Ile Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Leu
 35 40 45

20 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 43
 Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu
 30 1 5 10

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 44
 Lys Ser Leu Tyr Asn Thr Val Cys Val
 1 5

<210> 45
 <211> 13
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

50 <400> 45
 Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:

a) una primera composición que comprende una partícula de vector opcionalmente con un adyuvante, comprendiendo la partícula de vector, un vector de expresión recombinante en el que el vector de expresión recombinante comprende un polinucleótido que codifica un antígeno asociado a cáncer, y en el que el polinucleótido está unido de forma funcional a al menos una secuencia de expresión reguladora, y

b) una segunda composición que comprende un agonista de TLR4 en el que la composición no comprende antígeno;

en el que la primera composición y la segunda composición comprenden cada una además un excipiente farmacéuticamente adecuado,

para su uso en un método de aumento de linfocitos T en un microentorno tumoral en un sujeto,

donde la primera composición se administra de forma sistémica, induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria contra el antígeno asociado a cáncer en el sujeto; y donde la segunda composición se administra por vía intratumoral o peritumoral al sujeto; y donde la primera y segunda composición se administran simultánea o secuencialmente; aumentando de ese modo los linfocitos T en el microentorno tumoral, en el que, cuando está presente, el adyuvante es glucopiranosil lípido A (GLA).

2. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agonista de TLR4 es glucopiranosil lípido A (GLA).

3. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el cáncer es un cáncer inducido por virus oncógeno, o en el que el antígeno asociado a cáncer se selecciona de CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 y MAGE-A, antígeno T de BK, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, cinasas dependientes de ciclina, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPEmbr-abl, BCR-ABE, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , transductor 1 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, tirosina cinasas receptoras, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), tirosina cinasas citoplásmicas, familia src, syk-ZAP70, cinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STAT5 y STAT6, factores inducibles por hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α , factor nuclear Kappa B (NF- κ B), receptores Notch, Notch1-4, c-Met, dianas de mamífero de rapamicina (mTOR), WNT, cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, 5T4 de carcinoma de células renales, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de corte de traslocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión de ETS de TMPRSS2), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, poli(ácido siálico), MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelina, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumaina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, y antígeno 1 relacionado con fos.

4. El kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el vector de expresión recombinante se selecciona de un genoma de vector retrovívico, un genoma de vector lentivívico, genoma de vector poxvívico, genoma de vector de virus vaccinia, genoma de vector adenovívico, genoma de vector de virus adenoasociado, genoma de vector herpesvívico, genoma de vector de alfavirus, ADN y ARN plasmídico.

5. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la partícula de vector es una partícula de vector lentivívico y comprende un genoma de vector lentivívico.

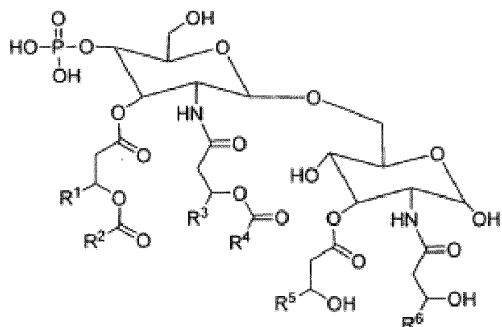
6. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que la partícula de vector lentivívico comprende además una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1, en el que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, y en el que la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con la proteína E3 del virus Sindbis, y preferiblemente en el que la partícula de vector lentivívico suministra el vector de expresión recombinante a una célula dendrítica.

7. El kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la segunda composición se administra en combinación con una composición que comprende un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor del punto de control, una citocina, cloroquina, un anticuerpo que

aumenta ADCC, un anticuerpo que promueve una señal coestimuladora, un anticuerpo anti-CD40.

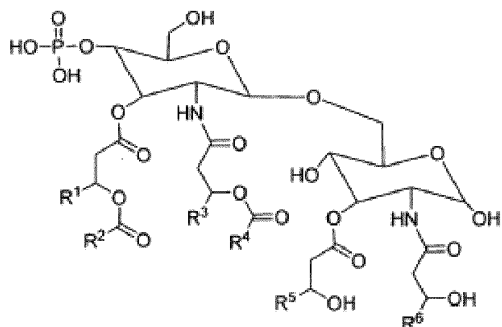
8. El kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además administrar una composición de refuerzo que comprende un adyuvante en combinación con un polipéptido, en el que el polipéptido comprende el antígeno asociado a cáncer, o un fragmento inmunógeno de mismo.

- 5 9. El kit para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el GLA se formula en una emulsión de aceite en agua estable, y/o en el que el GLA tiene la fórmula: (I)



donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀.

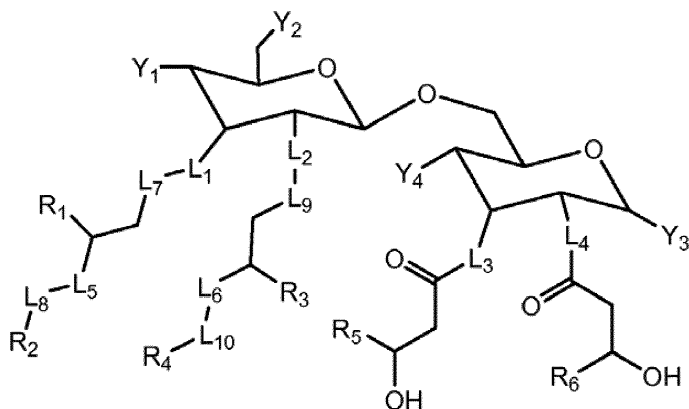
10. El kit para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el GLA tiene la fórmula: (I)



10

donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son igual a undecilo, y R² y R⁴ son igual a tridecilo.

11. El kit para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el GLA tiene la fórmula: (II)



15

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que: L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ y L₆ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -O-, -NH- y -(CH₂)-; L₇, L₈, L₉ y L₁₀ son iguales o diferentes y, cada vez que aparecen pueden estar ausentes o ser -C(=O)-; Y₁ es un grupo funcional ácido; Y₂ e Y₃ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente de -OH, -SH y un grupo funcional ácido; Y₄ es -OH o -SH; R₁, R₃, R₅ y R₆ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente del grupo de alquilo C₈-C₁₃; y R₂ y R₄ son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente del grupo de alquilo C₆-C₁₁.

20

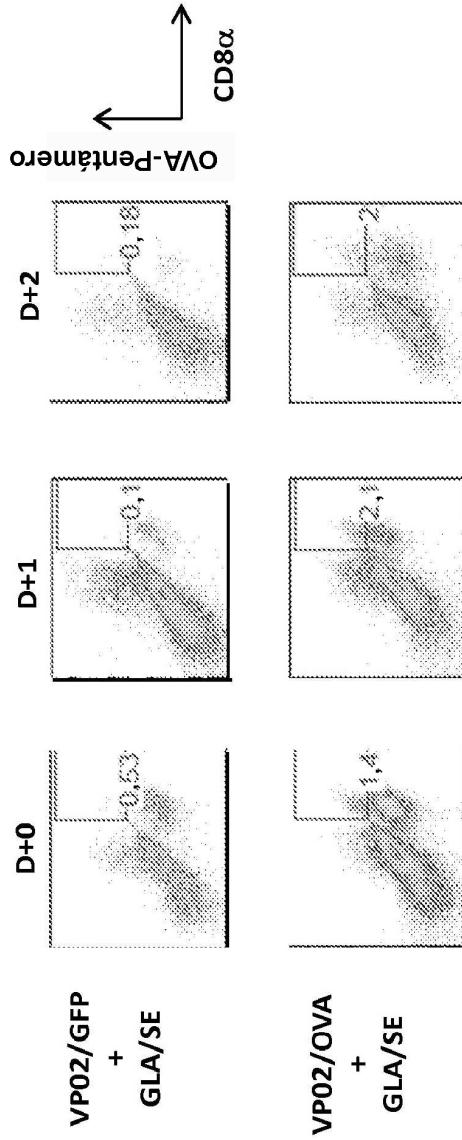


FIGURA 1A

	D+0	D+1	D+2
VP02/GFP+ GLA (A)	0,5	0,4	0,5
VP02/OVA + GLA (B)	1,9	2,7	3,4
Relación (B/A)	3,8	6,8	6,8

FIGURA 1B

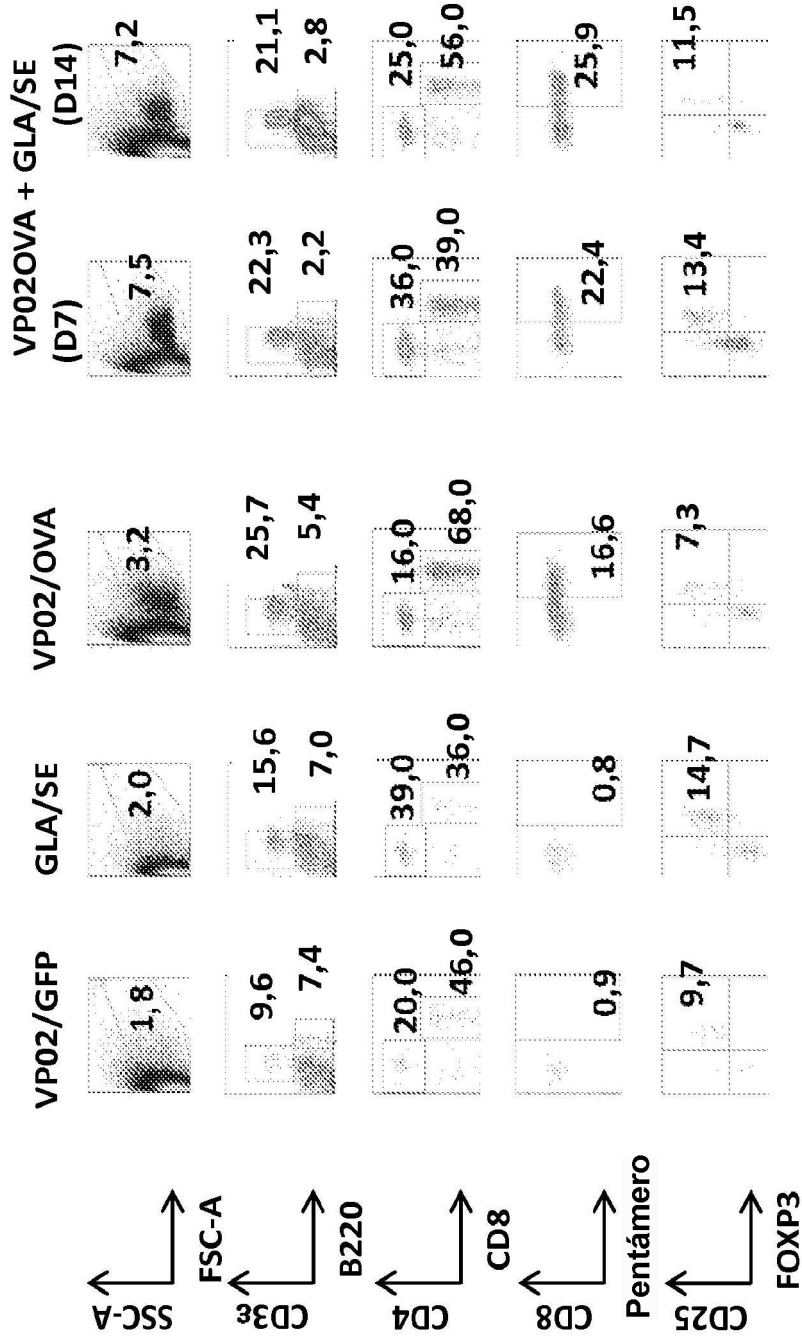


FIGURA 2A

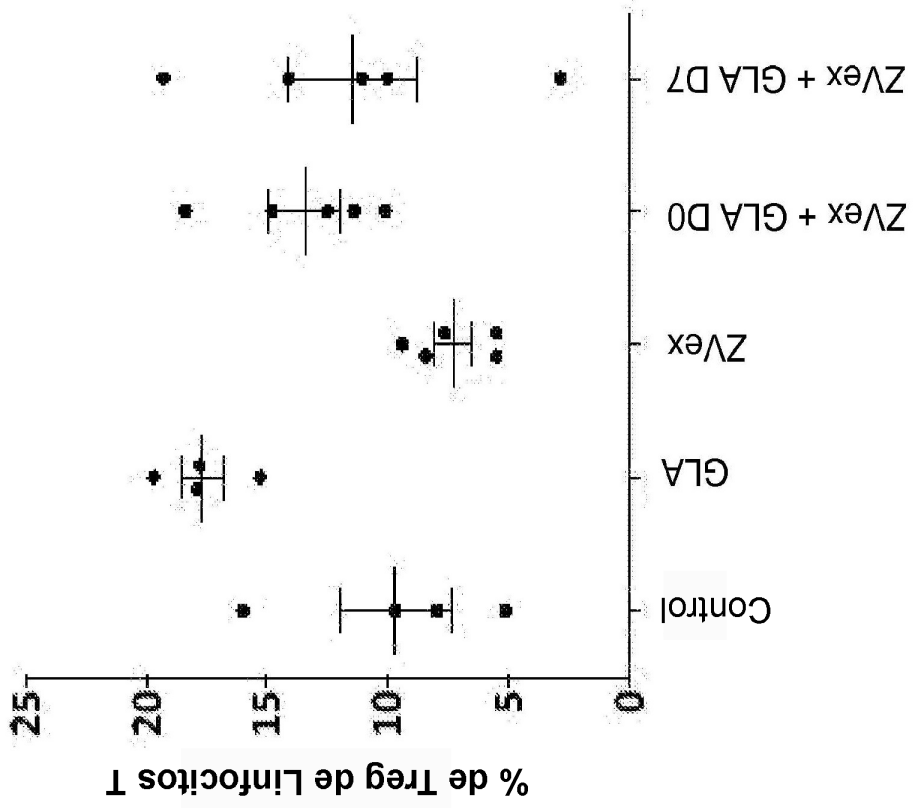
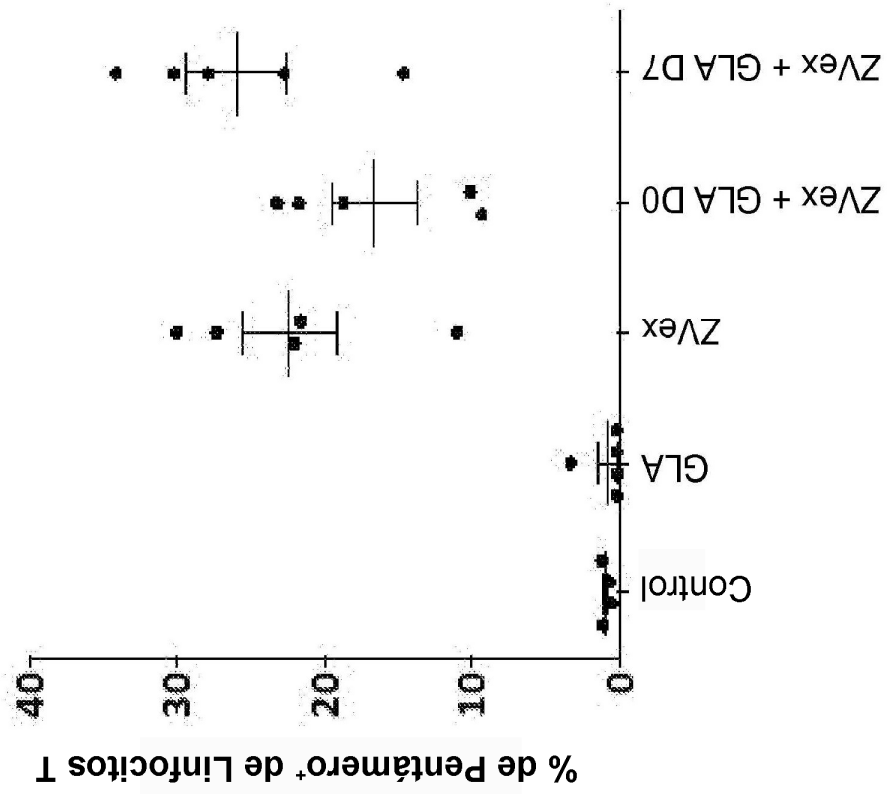


FIGURA 2B



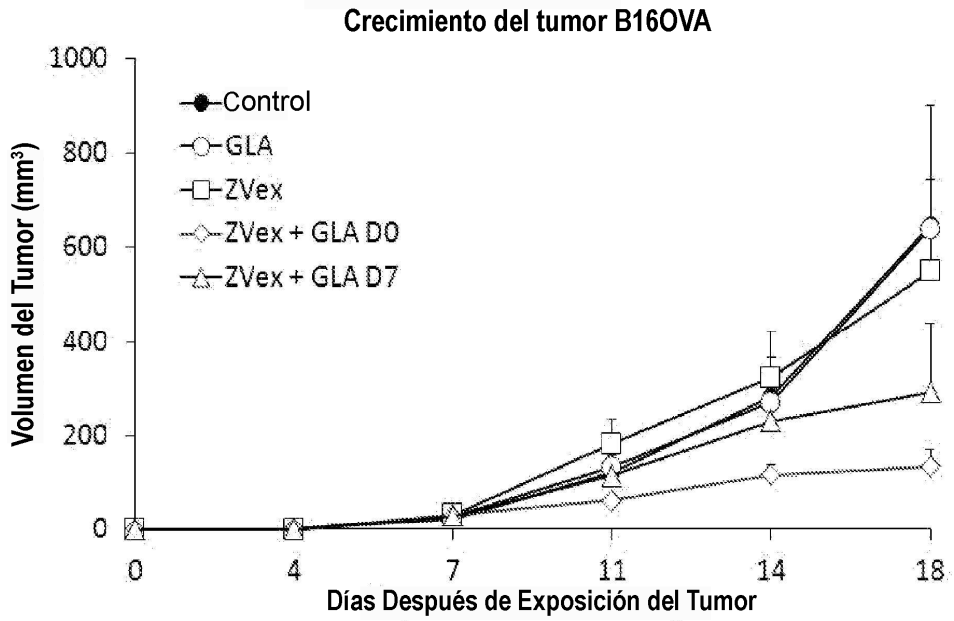


FIGURA 3A

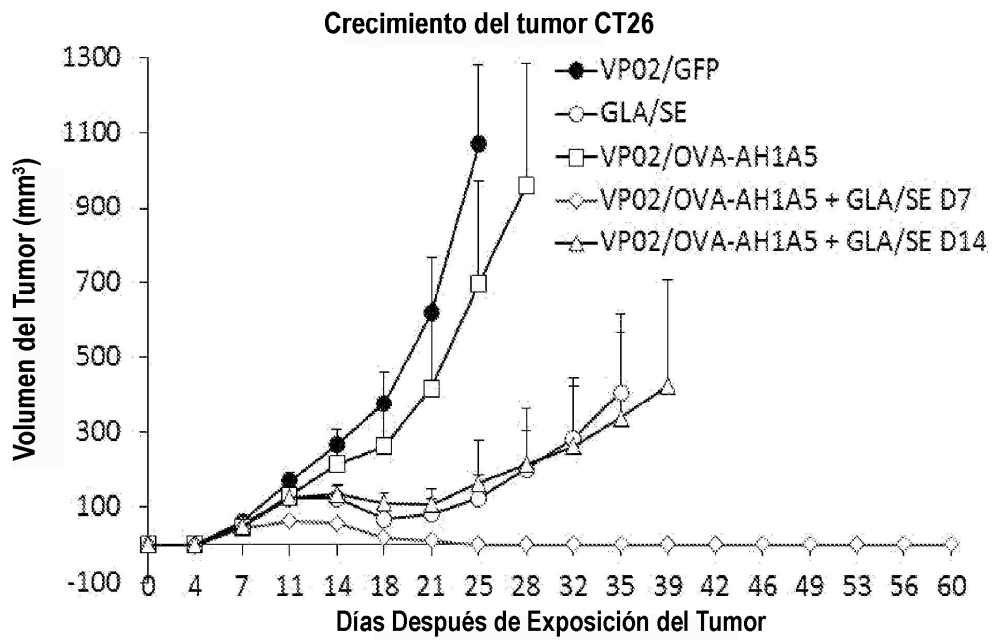


FIGURA 3B