



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 344**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04743671 .2**
96 Fecha de presentación : **05.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1667715**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Sistema de suministro de antígenos.**

30 Prioridad: **05.08.2003 GB 0318247**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **The Royal Veterinary College
University of London, Royal College Street
London NW1 0TU, GB**

72 Inventor/es: **Werling, Dirk**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 344 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

Sistema de suministro de antígenos.

5 La presente invención se refiere a un sistema de suministro de antígenos. En particular, se refiere a un sistema que puede ser usado para vacunar animales contra enfermedades y para distinguir entre animales vacunados y animales infectados naturalmente.

10 La comprensión y la manipulación selectiva del sistema inmune adaptativo y innato natural en animales es altamente favorable desde una vista de la protección de los animales, tanto en los animales de granja como en los animales de compañía, de la enfermedad y de una disminución en la dependencia de la intervención de antibióticos para el control de la enfermedad debido a los crecientes riesgos de resistencia a los antibióticos, un tema de creciente importancia en todas las especies.

15 Los antibióticos son frecuentemente utilizados en una base indiscriminada para la protección de especies de animales agrícolas y de compañía contra un amplio rango de patógenos. Esta cultura del uso inapropiado de antibióticos desarrollo a través de los malos resultados de los antígenos de patógenos con respecto a la inmunidad protectora.

20 Por lo tanto, la necesidad de desarrollar y mejorar nuestro entendimiento del papel de anfitrión de inmunidad adaptativa en la protección del agente patógeno esta siendo impulsado, por ejemplo, tanto por cuestiones de bienestar animal y la creciente exigencia de los consumidores de carne de alta calidad con reducción de residuos de antibióticos.

25 Ahora hay una investigación creciente en antígenos moleculares con el propósito de inducir a la protección en las especies animales para su uso en productos de la vacuna. Sin embargo, debido a que tales productos raramente toman en cuenta los requerimientos para la maduración del sistema inmune celular con respecto a la protección de animales de la enfermedad, esta ha tenido eficacia limitada en muchos casos.

30 Una de las limitaciones de la vacunación como un medio de control de la enfermedad es la dificultad de distinguir a animales infectados naturalmente y animales vacunados. Por ejemplo, esta era una cuestión importante con relación con el brote reciente de la enfermedad de la fiebre aftosa (FA) en el Reino Unido, don de la vacunación no fue utilizado en parte por la razón de que una vez que un rebaño de vacas nacionales es vacunado, ciertos países no permitirán importaciones de ganado de la manada. Los métodos actuales de vacunación también disminuyen el valor del mercado de la carne como el cuerpo tiene que ser tratado como si estuviera infectado, y colgado durante mas tiempo para matar cualquier virus que pueda estar presente. Para la FA se hace hincapié en mantener los rebaños limpios, pero es casi imposible mantener los rebaños limpios ya que la transmisión es un problema (ej., de ratas, tejones etc). Las vacunas marcadoras, las cuales contienen un inmunógeno extranjero a los animales vacunados, se han propuesto como una forma de distinguir animales vacunados y animales infectados naturalmente.

40 US 2002/0187131 (D2) revela métodos para el suministro de antígeno aumentado a células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas y la modulación de la respuesta inmune de ella.

45 Propongo que atacando a las células dendríticas usando una fracción la cual se une selectivamente a las células dendríticas, en combinación con un antígeno tal como una referencia a una enfermedad del animal, y tal fracción el cual se une selectivamente como se dijo no ocurre naturalmente en esa especie de animales, proporciona no solo un nuevo concepto de suministro de antígeno (vacunación), pero también permite la discriminación entre animales vacunados y infectados naturalmente.

50 Un primer aspecto de la invención proporciona un compuesto para la vacunación de un animal que comprende (i) una fracción seleccionada del gp120 de VIH, de la proteína LAM de *Mycobacterium tuberculosis* o una glicoproteína del virus de Ébola, o una parte del mismo la cual se une a DC-SIGN en una célula dendrítica y es mayor que 10 aminoácidos en tamaño; y (ii) un antígeno.

55 La fracción une una célula dendrítica pero no se une sustancialmente a otros tipos de células presentadoras de antígeno. Si una fracción se une selectivamente con se ha dicho puede ser determinado mediante la medición de la unión de la fracción de células dendríticas comparado a la unión de otras células presentadoras de antígeno, por ejemplo usando una fracción vinculante de fluorógenos y la medición de la fluorescencia asociado con las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. Alternativamente, un anticuerpo anti-fracción puede ser usado para determinar que células la fracción une con el fin de determinar su selectividad por las células dendríticas.

60 Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno muy potentes y se ha demostrado ser eficaz como adyuvante fisiológicos para provocar la inmunidad profiláctica o terapéutica. Capturan microorganismos que entran en los tejidos periféricos de la mucosa y luego migran a órganos linfoides secundarios, donde se presentan estos microorganismos en forma antihigiénica a las células T en reposo y así iniciar la respuesta inmune adaptativa.

65 Es sabido que las células dendríticas tiene presentes en sus superficies proteínas, generalmente receptoras, las cuales están expresadas selectivamente y las cuales pueden ser usadas como un blanco por una célula dendrítica. Así, la fracción se une a un receptor el cual el mismo es expresado selectivamente en células dendríticas. Normalmente, un receptor que se expresa en forma selectiva en una célula dendrítica es una la cual esta presente en un nivel 10-

ES 2 356 344 T3

veces, preferible 100-veces, o mas preferible 1000-veces mayor en células dendríticas que otras células presentadoras de antígeno.

5 La fracción se une al receptor de reconocimiento de patrón DC-SIGN en una célula dendrítica. Un receptor de reconocimiento de patrón es un receptor que une un patógeno asociado patrón molecular.

DC-SIGN es también conocido como la célula específica de la molécula de adhesión intercelular 3 - cogiendo lectinas del tipo-C no integrinas, DC-SIGN, y es altamente expresado en la superficie de las células dendríticas. DC-SIGN es a veces también llamado CD209.

10

DC-SIGN es una proteína transmembrana de tipo II la cual forma un dominio citoplasmático N-terminal, un dominio de transmembrana, una región del cuello, una región de repeticiones en tándem y un dominio lectinas de unión manosa del tipo-C (calcio dependiente) en su termino-C. En el humano y el ratón DC-SIGN es expresado por células dendríticas presente en la dermis, lamina propia de los tejidos mucosos tales como el recto, útero y el cuello uterino, y en el área de células T de las amígdalas, ganglios linfáticos y el bazo. En los humanos DC-SIGN tiene 404 aminoácidos.

15

DC-SIGN ha sido encontrado en el humano, chimpancé, gorila, macaco, y donde el ADNc que codifica el polipéptido ha sido clonado. Las secuencias de aminoácidos y ADNc para DC-SIGN se encuentran en el siguiente Acceso del Banco de Genes Nos AF391086 (*macaca mulatta*), AY078913 (*Pan troglodytes*), NM_021155 (Humano) y NM_133238 (*Mus*). La figura 1 muestra una secuencia parcial de ADNc de una variante del bovino DC-SIGN. La secuencia de aminoácido deducido del variante de bovino 1 DC-SIGN, alineado con DC-SIGN del chimpancé, macaco y humano, es mostrada en la figura 3. La figura 6 muestra una secuencia parcial de ADNc de una segunda variante de bovino DC-SIGN. La secuencia de aminoácido deducido de variante de bovino 2 DC-SIGN, alineado con ratón, humano y variante de bovino 1 DC-SIGN, es mostrado en la figura 7. (ver ejemplo 7 para detalles de la clonación de ADNc).

25

Un análisis de dominio de la proteína SMART de humano, ratón y bovino (variante 2) DC-SIGN mostró que las proteínas comparten homología estructural, cada una contiene un receptor de lectinas de tipo-C. En DC-SIGN humano, el dominio de lectinas-C putativo es entre residuos 256 y 378; en ratón, el dominio lectinas-C putativo es entre residuos 108 y 229; y en bovino (variante 2) DC-SIGN, el dominio lectinas-C putativo es entre residuos 129-248.

30

Se cree que DC-SIGN es expresado selectivamente en la superficie de las células dendríticas y debido a su papel en el sistema inmune se cree que se puede conservar entre especies. Así, por ejemplo, el ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos del humano y ratón DC-SIGN comparte 44% de similitud de secuencia cuando se evaluaron mediante el programa informático descrito en la figura de leyendas.

35

Así, por DC-SIGN que incluyen cualquier proteína cuyo ADNc que codifica la secuencia polipeptídica tiene al menos 40% de similitud con la secuencia de nucleótidos de humano o ratón mostrado en la fig. 2.

40

En adición, la molécula DC-SIGN es normalmente una la cual puede unir ICAM-3 o otros miembros de la familia ICAM como puede ser determinado, por ejemplo, por ensayos descritos en Geijtenbeek *et al* (2002) J. Biol. Chem. 277, 11314-11320.

45

Los siguientes artículos describen la interacción entre DC-SIGN y VIH-1 o ICAM-3: Geijtenbeek *et al* (2002) J. Leukoc. Biol. 71, 921-931; Geijtenbeek *et al* (2002) J. Biol. Chem. 277, 11314-11320; Geijtenbeek *et al* (2000) Cell 100, 575-585; and Kooyk & Geijtenbeek (2002) Immunol. Rev. 186, 47-56.

50

En adición, I incluye cualquier proteína cuya polipéptido es codificado por un polinucleótido la cual se cruza en condiciones estrictas al polinucleótido cuya frecuencia es dada en cualquier Acceso del Banco de Genes Nos AF391086, AY078913, NM_021155 o NM_133238.

55

Por "condiciones estrictas" quiero decir hibridación a 6xSSC y 60°C por al menos 1 hora, y subsecuente lavado en 2xSSC a 60°C durante 30 minutos. 1xSSC es 0.15M NaCl/0.015M citrato de sodio.

También incluyo cualquier proteína el cual es reactiva inmunológicamente cruzada con humano o ratón DC-SIGN. Normalmente, esto puede ser estimado usando antisueros policlonados al DC-SIGN humano o ratón.

60

La fracción que une selectivamente a una célula dendrítica es una proteína.

El compuesto es normalmente usado para la vacunación de un animal. Normalmente, la fracción que une selectivamente es todo o parte de una molécula exógena o extrajera para el animal. Puede ser de otro animal, como el hombre, y es uno el cual es inmunogénica en el animal. Así, se vera que no solo hace la fracción que une selectivamente como dicho objetivo para el antígeno de la célula dendrítica, es ella la que también da lugar a una respuesta inmune (anticuerpo) el cual sirve como un marcador de la vacunación. En adición, la fracción la cual une selectivamente puede también actuar en la estimulación del sistema inmune, normalmente cebando una respuesta Th1, y así actúa como un adyuvante.

65

ES 2 356 344 T3

5 Varias fracciones han sido mostradas para unir DC-SIGN incluyendo la proteína LAM de *Mycobacterium tuberculosis* (ver, por ejemplo, Tailleux *et al* (2003) *J. Exp. Med.* 197, 1-5), una glicoproteína del virus de Ébola y el VIH-1 sobre la proteína gp120 (ver, por, ejemplo, Geijtenbeek *et al* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 11314-11320). Es preferible si la fracción de enlace se puede unir a DC-SIGN con alta afinidad. Será apreciado que solo una parte de estas moléculas son requeridas a efecto vinculante a una célula dendrítica. Tales partes están incluidas en el término de “una fracción la cual une una célula dendrítica”. Es preferible, sin embargo, si todos o una parte sustancial de la molécula es usado como la fracción de enlace.

10 Es particularmente preferido si la fracción que se une selectivamente a una célula dendrítica es VIH-1 dotado de glicoproteína gp120. Bajo infecciones naturales ocurridas, DC-SIGN interviene en la transferencia de VIH por las células dendríticas de las superficies mucosas (sitio de exposición al VIH) hacia órganos linfoides (sitio de infección por el VIH). Esta transferencia puede tomar varios días durante la cual el VIH es protegido de degradación y retiene su infectividad. Un mecanismo potencial es a través de endocitosis del VIH al unirse DC-SIGN solo para volver a la superficie de la célula después de la llegada de la célula dendrítica a los ganglios linfáticos y la interacción con las células-T. Esta hipótesis de internalización es apoyado por la presencia de dos motivos endocitosis potencial, LL y YXXL, en el dominio citoplasmático de DC-SIGN. Estos motivos han sido mostrados para mediar la endocitosis y el reciclaje en varios contextos. El VIH-1 ligado a DC-SIGN transitoriamente expresado en las células-293T mantiene su infectividad por varios días pero es susceptible al tratamiento con tripsina. Esto puede apuntar a la incapacidad de DC-SIGN expresando células-293T a endocytose VIH-1. Sin embargo es posible para la internalización del VIH-1 ser un mecanismo significativo de la protección del VIH-1 en las células dendríticas.

Los motivos LL y YXXL son conservados entre especies, como el homólogo humano de la molécula DC-SIGN ha sido encontrado en el ratón para contener estos motivos.

25 Como el enlace inicial del VIH-1 es mediado por su gp120 dota de proteína para DC-SIGN expresado en células dendríticas y dada la importancia de DC-SIGN en la recepción, transporte y transmisión del VIH-1 a las células-T, antígenos relacionados a la molécula gp120 pueden ser usados para dirigir mas directamente las células dendríticas con una muy alta eficiencia, así proporcionar un ejemplo de los nuevos enfoques de la vacunación descritos en este documento.

30 Así, orientando DC-SIGN usando la proteína gp120 del VIH puede: (a) estimular la respuesta inmune innata del huésped orientando el antígeno mas potente que presenta células y así potencialmente limitando el número de aplicación de la vacuna, la cantidad requerida por vacunación, como eliminando el miedo de cualquiera de los residuos de los antibióticos o la superación de cepas bacterianas resistentes; y (b) permitiendo la discriminación de animales vacunados y infectados naturalmente analizando la respuesta del anticuerpo a la molécula gp120 del VIH, una proteína no natural en el animal vacunado, usando sistemas de prueba disponibles comercialmente.

35 Las partes de la fracción de la invención están aptos para unir DC-SIGN en una célula dendrítica. La parte de la misma es mayor que 10 residuos de aminoácidos en longitud, más típicamente superior que 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 o 70 residuos de aminoácidos en longitud.

40 Aunque la proteína LAM microbacterial une DC-SIGN y pueden ser útil en la practica de la invención, será apreciado que algunos animales de libre recorrido tales como el ganado, ovejas, caballos, cabras, ciervos etc están en contacto con microbacterias y pueden infectarse con ellas. En consecuencia, es preferible que la proteína LAM microbacterial no es usada como la fracción que une a una célula dendrítica cuando el animal es una animal de recorrido libre (u otro animal que puede ser infectado mycobacterium).

45 Preferiblemente, el compuesto es uno el cual es endocitosis por la célula dendrítica siguiendo el enlace a dicha célula.

50 Por “antígeno” I incluye cualquier fracción el cual puede provocar una respuesta inmune, si humoral o celular mediada, por ejemplo a través de la producción de anticuerpos, y CD8-mediada, y respuestas de la célula NK-mediada. El antígeno se puede referir a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Varias macromoléculas pueden actuar como antígenos, incluyendo todas las proteínas (si esta presente en el contexto correcto), incluyendo nucleoproteínas, lipoproteínas, la mayoría de los polisacáridos (especialmente polisacáridos grandes), y varias pequeñas moléculas (usualmente llamadas haptenos) si están adjuntas a proteínas o polipéptidos o otros conductores. El termino “antígeno” también incluye moléculas que son multivalentes, que tienen múltiple epítotos, o monovalentes, que tienen un solo epítoto.

55 En el contexto de producción de vacuna, el antígeno es una molécula, o parte de la misma, o variante de la misma, asociado con una enfermedad. En particular, en el contexto de una vacuna de animal el antígeno es una molécula, o parte de la misma, asociado con una enfermedad del animal a ser vacunado. Antígenos están asociados con enfermedades que envuelven un patógeno, particularmente enfermedades infecciosas, y es particularmente preferible si el antígeno es una porción antigénica o inmunogénica de un componente de un patógeno, tales como un microorganismo infeccioso.

ES 2 356 344 T3

Patógenos incluyen aquellos asociados con las siguientes enfermedades: la fiebre aftosa, la enfermedad vesicular porcina, peste de pequeños rumiantes, dermatosis nodular contagiosa, lengua azul, peste equina africana, peste porcina clásica, enfermedad de Newcastle, estomatitis vesicular, peste bovina, perineumonía contagiosa bovina, fiebre del valle Rift, viruela ovina y caprina, la peste porcina africana, y la influenza aviar altamente patógena. Estas son enfermedades transmisibles que tienen el potencial de propagación muy seria y rápida, independientemente de las fronteras nacionales, que son de graves consecuencias económicas o de salud pública y que son de mayor importancia en el comercio internacional de animales y productos de origen animal y de están en la Lista A de enfermedades de la OIE (Oficina Internacional de Epizootias; www.oie.int).

Los patógenos también incluyen aquellos asociados con lo siguiente: Enfermedades comunes a varias especies incluyendo el ántrax, enfermedad de Aujeszky, equinococosis/hidatidosis, cowdriosis, la leptospirosis, el gusano barrenador del nuevo mundo (*Cochliomyia hominivorax*), el gusano barrenador del viejo mundo (*Chrysomya bezziana*), paratuberculosis, fiebre Q, la rabia, triquinosis; las enfermedades del ganado como la anaplasmosis bovina, babesiosis bovina, brucelosis bovina, citicercois bovina, campilobacteriosis genital bovina, encefalopatía espongiiforme bovina, tuberculosis bovina, dermatofitosis, leucosis bovina enzootica, septicemia hemorrágica, rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustulosa infecciosa, fiebre catarral maligna, teileriosis, tricomonosis, tripanosomiasis (transmitida por la mosca tse tse); enfermedades de ovino y caprino que incluyen brucelosis caprina y ovina (excepto *B. ovis*), artritis/encefalitis caprina, agalactia contagiosa, perineumonía contagiosa caprina, aborto enzootico de las ovejas (clamidiosis ovina), maedivisna, enfermedad ovina de Nairobi, epididimitis ovina (*Brucella ovis*), adenomatosis pulmonar ovina, salmonelosis (*S. abortusovis*), tembladera; enfermedades equinas que incluyen metritis equina contagiosa, durina, linfangitis epizoótica, encefalomiелitis equina (del este y oeste), anemia infecciosa equina, influenza equina, piroplasmosis equina, rinoneumonitis equina, arteritis viral equina, muermo, sarna caballo, viruela equina, encefalitis japonesa, surra (*Trypanosoma evansi*), encefalomiелitis equina venezolana, enfermedades de los porcinos que incluyen la rinitis atrófica de la especie porcina, encefalomiелitis por enterovirus, la brucelosis porcina, cisticercosis porcina, síndrome reproductivo y respiratorio porcino, gastroenteritis transmisible; y enfermedades lagomorfo que incluyen la mixomatosis, enfermedad hemorrágica del conejo y la tularemia.

Estas son algunas de las enfermedades de la Lista B de la OIE; y son enfermedades transmisibles que están consideradas a ser de importancia socio-económica y/o salud pública dentro de los países y que son importantes en el comercio internacional de animales y de productos de animales.

Patógenos particulares incluyen virus de la fiebre aftosa, VLF_e (virus de la leucemia felina), VIF (virus de la inmunodeficiencia felina), VDC (virus del distemper canino), Parvovirus, coronavirus, virus sincitial respiratorio bovino y diarrea viral bovina.

En adición, sin embargo, los antígenos están asociados con enfermedades las cuales no están necesariamente asociados con un patógeno que incluye, por ejemplo, cáncer donde los antígenos tumorales están asociados con la enfermedad. Normalmente, los antígenos tumorales son proteínas que son anormalmente sobreexpresado en el cáncer o que se expresan en un nivel anormal, por ejemplo, forma mutante, en el cáncer.

Los priones o partes de ellos son antígenos los cuales pueden ser usados en la práctica de la invención y no se cree que estén asociados con los organismos patógenos. Los priones están asociados con encefalopatías espongiiformes tales como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y la tembladera en las ovejas.

Antígenos de la vacuna para su uso en el contexto de la presente invención incluyen componentes antigénicos o inmunogénicos de microorganismos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos incluyendo helmintos, o partes de tales componentes, destinados a la prevención de enfermedades en animales o que provee protección contra enfermedades en los animales.

Antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, la proteína E2 del virus de la diarrea viral bovina (VDVB), la proteína gp51 del virus de la leucemia bovina, y las proteínas G o F del virus sincitial respiratorio (VSR). Las secuencias de aminoácidos para estas proteínas están codificadas en los genomas virales. Los Nos de Acceso del Banco de Genes para los genomas virales son: NC_001781 (VSR humano), NC_001989 (VSR bovino), AF033818 (virus de la leucemia bovina), AF091605 (tipo I VDVB) y AF145967 (tipo II VDVB).

Otros adecuados antígenos asociado con la enfermedad puede ser seleccionado por el experto en la materia y normalmente para muchos de dichos antígenos su secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc que los codifica están disponibles en el Banco de Genes.

El antígeno es normalmente todo o parte de un polipéptido asociado con una enfermedad tal como un componente polipéptido de un patógeno o un antígeno tumoral. La parte del polipéptido puede ser cualquier parte del polipéptido el cual es capaz de provocar una respuesta inmune como una respuesta de anticuerpos. Se sabe que los péptidos con 5 aminoácidos pueden provocar una respuesta de anticuerpos, aunque se utilizan normalmente péptidos mas grandes. Así, cuando el antígeno es un polipéptido puede tener al menos 5 aminoácidos, normalmente de 5 a 1000 aminoácidos, como 5 a 500, 5 a 200, 5 a 100, 5 a 50, 5 a 40, 5 a 30, 5 a 20, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

ES 2 356 344 T3

Se apreciará que el antígeno del compuesto de la invención puede ser a variante de una molécula asociado con una enfermedad provista que es capaz de provocar una respuesta inmune la cual es de protección contra la enfermedad. Tales variantes incluyen polipéptidos que tienen uno o más sustituciones de aminoácidos comparado al antígeno nativo asociado con la enfermedad, y hasta el 5% de sustituciones. Normalmente, las sustituciones son sustituciones conservadoras donde, por ejemplo, una “variante” se refiere a una proteína en donde en una o más posiciones ha habido inserciones de aminoácidos, supresiones, o sustituciones, ya sea conservadora o no conservadora, provistas que tales cambios resulten en una proteína cuyas propiedades básicas, por ejemplo la actividad enzimática (de tipo y actividad específica), termoestabilidad, actividad en un cierto rango de pH (estabilidad de pH) no han sido cambiados significativamente. “Significativamente” en este contexto significa que un experto en la materia dirá que las propiedades de la variante pueden ser diferentes pero no sería poco evidentes de los de la proteína original.

Por “sustituciones conservadoras” tiene por objeto combinaciones como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Tales variantes pueden ser hechos usando métodos estándar de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida.

Preferiblemente la fracción que se une selectivamente a una célula dendrítica según la Reivindicación 1 y el antígeno están unidos covalentemente. Cuando la fracción y el antígeno son cada uno a polipéptido, las dos partes pueden ser enlazados juntos por cualquier de las maneras convencionales de entrecruzamiento de polipéptidos. Por ejemplo, las dos partes del compuesto de la invención están unidas por cualquiera de las maneras convencionales de entrecruzamiento de polipéptidos, como aquellos generalmente descritos en O’Sullivan et al Anal. Biochem. (1979) 100, 100-108. Por ejemplo, la primera parte puede ser enriquecida con grupos tiol y la segunda parte reacciona con un agente bifuncional capaz de reaccionar con estos grupos tiol, por ejemplo el N-hidroxisuccinimida ester del ácido yodoacético (NHAY) o N-succinimidil-3-(2-pyridyldithio)propionato (SPDP), un agente de entrecruzamiento heterobifuncional el cual incorpora un puente disulfuro entre las especies conjugadas. Enlaces de amidas y tioeter, por ejemplo conseguidos con m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida ester, son generalmente más estables *in vivo* que los enlaces de disulfuro.

Adicionales agentes de entrecruzamiento útil incluyen ácido S-acetiltioglicólico N-hidroxisuccinimida ester (SATA) que es un reactivo thiolating para aminas primarias las cuales permiten desprotección del grupo sulfhidrilo bajo condiciones suaves (Julian *et al* (1983) Anal. Biochem. 132, 68), dimethylsuberimidate diclorhidrato y N,N’-o-phenylenedimaleimide.

Alternativamente, el compuesto puede ser producido como un compuesto de fusión (o polipéptido de fusión) por técnicas de ADN recombinantes mediante el cual una longitud de ADN comprende respectivas regiones codificando la parte polipéptido de la fracción que se une selectivamente a una célula dendrítica y el antígeno también se adjunta uno a otro o separados por una región codificando un enlazador péptido el cual no destruye las propiedades deseadas del compuesto.

Como se usa aquí, un polipéptido de fusión es uno que contiene un polipéptido el cual es la parte polipéptido de la fracción el cual se une a una célula dendrítica fusionado en el extremo terminal -N o -C de un polipéptido el cual es el antígeno del compuesto de la invención. Una manera simple de obtener tal polipéptido de fusión es por la traducción de una fusión en el marco de las secuencias de polinucleótidos, es decir un gen híbrido. El gen híbrido codificando el polipéptido de fusión es insertado en un vector de expresión el cual es usado para transformar o transfectar una célula huésped. Regiones de control de transcripción y traslación están normalmente presentes en vectores de expresión. El ADN es luego expresado en un huésped adecuado para producir un polipéptido que comprende el compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Se puede apreciar que el antígeno puede comprender dos o más moléculas asociadas con una enfermedad del animal o partes o variantes de tales moléculas.

De esta manera, un compuesto de la invención puede ser usado para vacunar contra más de una enfermedad. Así, por ejemplo, el compuesto puede comprender un antígeno de un agente de la enfermedad (ej., el E2 polipéptido del VDVB o una parte inmunogénica de la misma) y un antígeno de un segundo agente de la enfermedad (ej., la proteína F del VSR o un agente inmunogénico del mismo) en la misma cadena polipeptídica como la fracción el cual se une a la célula dendrítica. Otras variaciones serán evidentes al experto en la materia.

Un segundo aspecto de la invención comprende una molécula de ácido nucleico codificando un compuesto de fusión del primer aspecto de la invención.

Adecuadas moléculas de ácido nucleico pueden fácilmente ser sintetizados o contruidos por un experto en la materia usando métodos rutinarios tales como se describen en los manuales de clonación incluyendo Sambrook, J. y Russell, D. (2001) “Molecular Cloning: a laboratory manual” 3rd ed. Vol 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Normalmente el ácido nucleico es el ADN, pero puede ser ARN. En lo siguiente, donde el ADN es usado, a menos que el contexto indique lo contrario, el ARN es también incluido.

Secuencias de ADN que codifica el antígeno del compuesto del primer aspecto de la invención puede ser identificados mediante la búsqueda en una base de datos de secuencias de ADN, como el Banco de Genes y similares.

ES 2 356 344 T3

Ejemplos de secuencias de ADN que codifica para antígenos adecuados se han expuesto anteriormente. Una vez que una secuencia que codifica el antígeno elegido es conocido, puede ser usado para diseñar cebadores y/o sondas que son útiles en el aislamiento específico en una secuencia de ADN o ADNc que codifica el antígeno, por ejemplo del patógeno asociado con la enfermedad a ser combatida. Si una secuencia de ADN es conocida, los cebadores y sondas pueden ser diseñados usando programas disponibles comercialmente y sintetizado por síntesis automatizada. En general, una secuencia de ADN que codifica el antígeno puede ser aislada de una biblioteca de secuencias ADNc o ADN generado de una fuente apropiada, como el patógeno seleccionado. La biblioteca puede ser revisada para las secuencias de ADN de interés usando una sonda complementaria a una secuencia de ADN conocida que codifica un antígeno seleccionado, de preferencia bajo condiciones de alta exigencia. Las secuencias de ADN que se hibridan con la sonda pueden ser subclonadas y el polipéptido codificado por la secuencia ADN puede ser confirmado por una análisis de secuencia de ADN y/o por traslado *in vitro*, expresión y detección del polipéptido o como ensayo. Normalmente, sin embargo, secuencias de ADN adecuadas que codifica el antígeno pueden ser sintetizados usando el PCR y cebadores adecuados dirigidos en los extremos 5' y 3' de la región codificante como es bien sabido en la materia.

Una vez que la secuencia ADN codificada por el antígeno seleccionado es aislado, puede ser unido operativamente a la secuencia de ADN que codifica la fracción la cual se une a la célula dendrítica según la Reivindicación 1, por ejemplo el VIH de gp120 el cual se une selectivamente a DC-SIGN de las células dendríticas. La secuencia de ADN que codifica el antígeno y la fracción la cual se une a una célula dendrítica están en el mismo marco de lectura unido operativamente a regiones de control de transcripción y traslado. Las regiones de control de transcripción y traslado incluyen promotores, potenciadores, elementos de reguladores cis, secuencias de poliadenilación, regiones de iniciación de transcripción y traslado, y secuencias de terminación de transcripción.

El ADN es luego expresado en un huésped adecuado para producir un polipéptido que es un compuesto del primer aspecto de la invención. Así, el ADN que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede ser usado en conformidad con las técnicas conocidas, modificado apropiadamente en vista de las enseñanzas contenidas en este documento, para construir un vector de expresión, el cual es usado luego para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención.

Así, el ADN que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede unirse a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para su introducción en un huésped adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del huésped, la manera de la introducción del ADN en el huésped, y si se desea un mantenimiento episomal o la integración.

Generalmente, el ADN es insertado en un vector de expresión, como un plásmido, en una adecuada orientación y un correcto marco de lectura para la expresión. Si es necesario, el ADN puede ser unido a las apropiadas secuencias de nucleótidos de control regulatorias de transcripción y traslado reconocido por el huésped deseado, aunque tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. El vector es luego introducido en el huésped a través de técnicas estándar. Generalmente, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por tanto, será necesario seleccionar para las células huéspedes transformados. Una técnica de selección implica la incorporación en el vector de expresión una secuencia de ADN, con cualquiera de los elementos de control necesario, que codifica un rasgo seleccionable en la célula transformada, como una resistencia antibiótica. Alternativamente, el gen para tal rasgo seleccionable puede ser otro vector, el cual es usado para co-transformar la célula huésped deseada.

Las células huéspedes que han sido transformadas por el ADN recombinante de la invención son luego cultivadas por un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas conocidos por expertos en la materia en vista de las enseñanzas descritas en este documento para permitir la expresión del polipéptido, que luego pueden ser recuperados.

Muchos sistemas de expresión son conocidos, incluyendo la bacteria (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células animales, células vegetales y células de insectos.

Los vectores incluyen un replicón procariontes, como el ColE1 *ori*, para la propagación en un procarionte, incluso si el vector es usado para la expresión de otras, no procariontes, tipos de células. Los vectores pueden también incluir un promotor apropiado como un promotor procarionte capaz de dirigir la expresión (transcripción y traslado) de los genes en una célula huésped bacteriana, como la *E. coli*, transformada con ella. Normalmente, es una el cual puede estar integrado de forma estable en una célula huésped y/o da alta expresión del compuesto. Un vector adecuado incluye ADNpc 3.1 (+/- Su etiqueta) disponible de Invitrogen.

Por "promotor" l significa un elemento de control de expresión formado por una secuencia ADN que permite la unión de la polimerasa ARN y la transcripción que se produzca. Secuencias promotoras compatibles con huéspedes ejemplares son provistas normalmente en vectores plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.

Otro aspecto de la invención por consiguiente provee una célula huésped transformado con u ácido nucleico que codifica el compuesto de acuerdo al primer aspecto de la invención.

En particular, las células huéspedes preferidas para la expresión del compuesto de la invención incluyen células COS y CHO las cuales son aptos para las proteínas glicosiladas. Las células *E. coli* pueden ser usadas y en ese caso,

ES 2 356 344 T3

el componente lipopolisacárido que puede estar presente en el producto final del compuesto puede ser en si misma un inmunoestimulante. Esto puede ser beneficioso en algunas circunstancias, pero puede no ser deseable en otras donde puede comprometer la medición de una respuesta inmune.

5 El cultivo de la célula huésped bajo condiciones que permitan la expresión del polímero de ADN es llevado a cabo convencionalmente. El producto puede ser recuperado por métodos convencionales según la célula huésped y según su localización del producto de expresión (intracelular o secreta en el medio de cultivo o en el periplasma celular). Así, cuando la célula huésped es bacteriana, como la *E. coli* puede, por ejemplo, ser lisis físicamente, químicamente o enzimáticamente y el producto de proteína aislado del lisado resultante. Cuando la célula huésped es mamífero, el producto puede generalmente ser aislado de nutrientes medios o de extractos libres de células. Cuando la célula huésped es una levadura como la *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, el producto puede generalmente ser aislado de células lisis o de medios de cultivo, y luego mas adelante purificado usando técnicas convencionales. La especificidad del sistema de expresión puede ser evaluada por Western Blot usando un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de interés.

15 Técnicas convencionales de aislamiento de proteínas incluyen cromatografía de adsorción de precipitación selectiva, y cromatografía de afinidad incluyendo una columna de afinidad de anticuerpo monoclonal.

20 Se puede apreciar que la invención puede ser practicado usando un vector de “expresión cassette” el cual contiene una secuencia de codificación para la fracción la cual une una célula dendrítica, como el VIH-1 gp120, que puede fácilmente ser fusionado a una región de codificación por el antígeno elegido el cual es insertado en un lugar apropiado en el vector de expresión de cassette.

25 Normalmente, la molécula de ácido nucleico toma la forma de un vector de expresión el cual contiene señales de control de transcripción y traslado adecuados para permitir la expresión del polipéptido de fusión una vez que la región de codificación del antígeno ha sido insertado en el punto de inserción. Como se sabe en la materia, el punto de inserción en un vector de “expresión de cassette” es uno que fácilmente permite para la inserción de la secuencia de codificación adecuada (una codificación de un antígeno en este caso) de modo que se produce una fusión inframe. Normalmente, el punto de inserción es un sitio de restricción único dentro del ácido nucleico.

30 Normalmente, el vector es uno el cual puede ser integrado de forma estable en una célula huésped y/o dar un elevado nivel de expresión del compuesto. Esto puede, convencionalmente estar basado en el vector ADNpc3.1 (+/- His etiqueta) disponible de Invitrogen.

35 Dado que el antígeno puede ser fusionado a la fracción de unión en su N-terminal o C-terminal, el punto de inserción puede estar en el extremo 5' o el extremo 3' de la secuencia de codificación para fracción de unión, y adecuadas señales de transcripción y traslado colocadas apropiadamente como se conoce al experto en la materia.

40 El compuesto del primer aspecto de la invención proporciona un compuesto según el primer aspecto de la invención para su uso en la medicina. Normalmente, el compuesto es empaquetado y presentado como un medicamento para su uso en un animal.

45 Todavía un aspecto mas de la invención proporciona una vacuna que comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención es preferentemente con adyuvante en la formulación de la vacuna de la invención. Adyuvantes adecuados están disponibles comercialmente tales como el Aluminio y el Quil A.

50 Es preferible que la composición adyuvante induce una respuesta inmune predominante del tipo Th1. Altos niveles de citosina del tipo Th-1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de repuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Preferiblemente, el compuesto puede dar lugar tanto a una repuesta Th1 y Th2.

Todavía un aspecto mas de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 El portador(es) tiene que ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con el compuesto de la invención y no perjudiciales para los recipientes de los mismos. Normalmente, los portadores serán el agua o solución salina que será estéril y libre de pirogenos. Sin embargo, otros portadores aceptables pueden ser usados.

60 Normalmente, las composiciones farmacéuticas o formulaciones de la invención son para la administración parenteral, mas concretamente para la administración intravenosa. Las composiciones o formulaciones serán administradas por las siguientes rutas: intramuscular, subcutánea, intradérmica, intranasal, intravenosa, oral, y intraperitoneal. Intramuscular es mas preferido porque es la forma mas practica para un veterinario.

65 Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas de inyección estéril los cuales pueden contener antioxidantes, soluciones tampón, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación isotónica con la sangre del destinatario; y suspensiones acuosas y no acuosas estéril los cuales pueden incluir agentes de suspensión y gentes de espaciamento.

ES 2 356 344 T3

Las composiciones pueden ser dirigidas a la inmunización y la protección de animales, de preferencia animales de importancia económica, incluyendo los animales de granja como las vacas, ovejas, cabras, cerdos, caballos y conejos, y animales de compañía, como gatos y perros. Dependiendo en el tipo de antígenos usados, la inmunización de animales con estos antígenos puede resultar en la prevención de la infección, mejoría de los síntomas, disminución de la mortalidad y/o inducción de anticuerpos neutralizantes.

Las enfermedades que pueden ser inmunizados contra o combatir usando los compuestos de la invención incluyen VDVB, VSR y el virus de leucemia bovina y antígenos apropiados pueden ser seleccionados por ejemplo de la proteína E2 VDVB, las proteínas F y G VSR y gp51 del virus de leucemia bovina. Así, el compuesto de la invención puede ser usado profilácticamente o terapéuticamente.

Normalmente, la enfermedad a ser tratada es uno causado por un patógeno. Sin embargo, los tumores pueden también ser tratados.

Los tumores que pueden ser tratados por los compuestos de la invención incluyen melanomas (ver, por ejemplo, Nestle, F.O. (2002) *Dermatología Clínica & Experimental* 27(7), 597-601). Normalmente, mas de un antígeno puede necesitarse con el fin de ser efectivo. Estos pueden ser combinados en el mismo compuesto de la vacunación o en los compuestos separados de tales. Normalmente, los antígenos pueden ser antígenos mutados (ej., p16 mutado (CDKN2A)), compartidos antígenos tumorales específicos (ej., MAGE-1, MAGE-3 y NY-ESO-1), antígenos de diferenciación (ej., tirosinasa, gp100 y MelanA/MART-1) o gangliósidos de la superficie celular (ej., GM2, GD2 y GD3) como de describe en Nestle (2002) *supra*.

El termino “tumor” debe entenderse como una referencia a todas las formas de crecimiento de células neoplásicas, incluyendo tumores de pulmón, hígado, glóbulos, piel, páncreas, estomago, colon, próstata, útero, mama, ganglios linfáticos y vejiga. Tumores sólidos están especialmente adecuados.

Todavía aspectos adicionales de la invención proveen el uso de un compuesto según el primer aspecto de la invención en la fabricación del medicamento para la lucha contra la enfermedad en un animal; o en la fabricación de una vacuna para la inmunización de un animal.

Particularmente realizaciones preferidas incluyen el uso de un compuesto que comprende (i) una fracción la cual selectivamente se une a una célula dendrítica en un animal pero la cual no ocurre naturalmente en dicho animal según la Reivindicación 1 y (ii) un antígeno relevante a una enfermedad en dicho animal en la fabricación de un medicamento para la lucha contra la enfermedad en el animal; y el uso de un compuesto que comprende (i) una fracción la cual selectivamente se une a una célula dendrítica en un animal pero que no ocurre naturalmente en dicho animal según la Reivindicación 1 y (ii) un antígeno relevante a la enfermedad en dicho animal en la fabricación de una vacuna para la inmunización del animal.

La invención incluye particularmente el uso de un compuesto para la vacunación de un animal que comprende (i) una fracción seleccionado de VIH gp120, la proteína LAM de *Mycobacterium tuberculosis* o una glicoproteína del virus de Ébola, o partes de las mismas según la Reivindicación 1, y (ii) un antígeno en la fabricación de un medicamento para la lucha contra la enfermedad asociada con el antígeno o en la fabricación de una vacuna para la inmunización del animal contra la enfermedad asociada con el antígeno.

Los animales vacunados con los compuestos de la invención pueden ser distinguidos de animales infectados naturalmente con el agente de la enfermedad co la cual el agente del compuesto de la invención es asociado desde que los animales vacunados han tenido una respuesta inmune a la fracción que se une a una célula dendrítica considerando que animales infectados naturalmente no lo hacen.

Así, un aspecto mas de la invención provee un método de determinar si un animal ha sido administrado un compuesto según el primer aspecto de la invención, el método comprende la determinación en una muestra que contiene anticuerpos tomado del animal si el animal ha tenido una respuesta inmune a la fracción en el compuesto según la Reivindicación 1. También puede ser útil determinar si el animal ha tenido una respuesta inmune al antígeno presente en el compuesto.

Normalmente, una muestra que contiene anticuerpos es tomado del animal y es determinado si un anticuerpo dirigido en dicha fracción esta presente. Ya sea un anticuerpo dirigido a dicho antígeno esta presente también puede ser determinado. Normalmente, la muestra es una muestra de sangre. Normalmente, la muestra de sangre se obtiene de la vena yugular o la vena de la cola del animal.

La invención también provee kits de partes que pueden ser usados para distinguir animales infectados naturalmente y aquellos administrados un compuesto del primer aspecto de la invención.

Un kit de partes que comprende (i) un compuesto según el primer aspecto de la invención y (ii) medios para detectar una respuesta inmune a la fracción presente en el compuesto según la reivindicación 1 y/o (iii) medios para detectar una respuesta inmune al antígeno en dicho compuesto.

ES 2 356 344 T3

Un kit de partes mas que comprende (i) medios para detectar una respuesta inmune a un antígeno de enfermedades animales (ii) medios para la detección de una respuesta inmune a una fracción seleccionada del VIH gp120, la proteína LAM de *Mycobacterium tuberculosis* o una glucoproteína del virus de Ébola, o una parte de la misma la cual se une a DC-SIGN en una célula dendrítica y es mayor que 10 aminoácidos en longitud.

En una realización preferida, la fracción de unión es VIH-1 gp120, o una parte de la misma mayor que 10 aminoácidos en longitud.

Normalmente, una respuesta inmune es detectado determinando si o no una muestra de los animales contiene anticuerpos adecuados (es decir, al antígeno y/o la fracción de unión).

Así, medios adecuados para detectar las respuestas o la respuesta inmune incluyen el uso de ELISA para determinar una respuesta de anticuerpos. Un ELISA para la medición de respuesta de anticuerpos gp120 está disponible comercialmente, por ejemplo de Laboratorios Advanced BioSciences Ltd o ImmunoDiagnostics Inc.

La invención será ahora descrita con mas detalles con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Fig. 1 muestra la secuencia de ADNc parcial codificando la variante 1 DC-SIGN bovina (SEQ ID No. 1). La letra "n" significa cualquiera de los cuatro nucleótidos que ocurre naturalmente A, G, C o T.

Fig. 2 muestra la alineación de secuencias ADNc que codifica DC-SIGN de chimpancé (*Pan troglodytes*), humanos, Macaca y el ratón (SEQ ID Nos. 2-5, respectivamente) usando el paquete de análisis de secuencia SE central (Align Plus y Clone Manager) del Software Científico y Educativo.

El alineamiento, parámetros y configuración son indicados. Guiones indican no nucleótidos.

Fig. 3 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos parcialmente deducida para la variante 1 DC-SIGN bovina (SEQ ID No. 6) contra la secuencia de aminoácidos para DC-SIGNs de chimpancé, humano y macaca (SEQ ID Nos. 7-9). Guiones indican no aminoácidos. Los asteriscos en la secuencia de aminoácidos DC-SIGN bovina son aminoácidos asignados. Los alineamientos fueron hechos usando el paquete de análisis de secuencia SE central. Los parámetros de Alineamiento fueron: alineamiento de Proteína Global contra la molécula de referencia; Parámetros: Matriz de puntuación: BLOSUM 62; Molécula de referencia putativa boDC-SIGN, región 1-577; Número de secuencias para alinear 4. Aminoácidos boDC-SIGN 192 putativos; aminoácidos chim_DC-SIGN 404; aminoácidos huDC_SIGN_CDS 404; aminoácidos Macaca mulatta_CDS 404.

Fig. 4 es un gráfico mostrando la unión de la gp120 del VIH-FITC al DC bovino. Las células fueron también dejadas sin tratar o fueron incubadas a 4°C o 37°C con gp120-FITC durante 60 minutos y analizada por citometría de flujo.

Fig. 5 muestra el patrón de tinción de los monocitos humanos derivados de macrófagos, monocitos humanos derivados de células dendríticas y monócito bovino derivado de células dendríticas con un anticuerpo policlonal formulado contra la molécula DC-SIGN humana.

Fig. 6 muestra la secuencia de ADNc parcial codificando el DC-SIGN bovino, variante 2 (SEQ ID No. 10).

Fig. 7 muestra un alineamiento CLUSTAL W (1.7) de las secuencias de aminoácidos del DC-SIGN humano (SEQ ID No. 11), DC-SIGN murino (SEQ ID No. 12), y las dos variantes de DC-SIGN bovino (SEQ ID Nos. 6 y 13 (variante 1 y 2, respectivamente)). Guiones indican ausencia de residuos coincidentes.

Ejemplo 1

La habilidad de la proteína gp120 para unirse a DC-SIGN en células bovinas

He mostrado por citometría de flujo que las proteínas gp120-FITC del VIH (Cat No. 1021-F y 1001-F, Immuno Diagnostic Inc., Woburn, USA) se une al DC bovino. La incubación del gp120-FITC del VIH a 4°C durante 1 hora inducida por el bajo nivel de unión, pero esta fue incrementada por incubación a 37°C (Figura 4).

Además, un anticuerpo policlonal anti-humano de conejo configurado contra la molécula DC-SIGN humano (amablemente proporcionado por Dr. T. Geijtenbeck (Departamento de Biología Celular Molecular, Facultad de Medicina, Vrije Universiteit Amsterdam) fue mostrado por microscopia de barrido láser confocal para teñir el DC bovino (Figura 5) en menor medida que el DC humano (Figura 5).

Para valorar la habilidad de la proteína gp120 del VIH-1 para unirse a DC-SIGN en células bovinas, ADNc codificando la proteína esta clonado en un vector de expresión que contiene un His-tag (es decir, tag histidina oligo). Como un control, una proteína no relacionada His-tag que se sabe no se une a DC-SIGN, como la ovoalbúmina FITC etiquetado (OVA), es usado. Para seguir la absorción de sp120-His por DC, un cultivo de DC es preparado y dividido en 4 grupos de células. Grupos primero (experimental) y segundo (control) son pulsados con cualquier gp120-His o una proteína His-tagged no vinculada durante 2 horas y lavado. El tercer grupo (control negativo) es solo tratado con

ES 2 356 344 T3

medio de crecimiento, considerando que el cuarto grupo (control de absorción) es usado para demostrar la habilidad de DC para tomar antígeno FITC etiquetado (en este caso OVA) como un control funcional para la habilidad de DC para tomar el antígeno. Subsecuentemente, todos los grupos de células son usados para observar el patrón de localización celular de proteínas por microscopia de fluorescencia confocal, usando un anticuerpo anti-His FITC etiquetado. Finalmente, los anticuerpos policlonales son formulados contra la molécula DC-SIGN bovina para mostrar la especificidad de la absorción de gp120-His vía DC-SIGN preincubando DC con estos anticuerpos para bloquear DC-SIGN. El bloqueo de DC-SIGN debería reducir la absorción de la gp120-His, pero no cualquier otra molécula o el control.

Adicionalmente o alternativamente, para evaluar la capacidad de la proteína gp120 para unir a DC-SIGN en células bovinas, el ADNc que codifica a la proteína es clonado en un vector de expresión que contiene un His-tag usando RT-PCR y enfoques de dirección clonación que se obtiene utilizando un programa NIH SIDA reactivo. El plásmido resultante es usado para transfectar células COS-7, y la proteína expresada esta concentrada desde el sobrenadante de células y/o lisados celulares usando un peso molecular de columna de giro de corte o una columna de purificación His-tag. La presencia de la gp120-His es evaluado por borrones de Western usando anticuerpos anti-His. Para seguir la absorción de la gp120-His por DC bovino, un cultivo Dc es preparado y dividido en 3 grupos de células. Grupos primero (experimental) y segundo (control) son pulsados ya sea con gp120 -His o sobrenadante derivados de células COS-7transfectadas con el plásmido vacío durante 2 horas y lavado. El tercer grupo (control de absorción; en este caso FITC-OVA) será usado como un control funcional para probar la habilidad de DC para tomar un antígeno (Werling, D *et al* (1999) J Leukoc Biol 66: 50-58). Subsecuentemente, todos los grupos de células son usados ya sea para observar la cantidad de proteína tomada o para identificar la localización celular de las proteínas por citometría de fluido y microscopia fluorescente confocal. Un anticuerpo anti-His FITC etiquetado es usado para detectar gp120-His. En adición, células COS-7, transfectadas establemente con la molécula DC-SIGN humana, son usados como control positivo.

Resultados

Basado en las similitudes actuales publicado en secuencias DC-SIGN, se espera que el gp120-His se une y subsecuentemente esta internalizado vía la molécula DC-SIGN bovina, y esta unión/absorción se bloqueara por anticuerpos policlonales, considerando que este no tendrá efecto en los controles usados.

Discusión

Para discriminar entre consolidados y internalizados gp120-His, uno puede medir la cantidad de gp120-His tomado por la célula, células se tratan con solución de tripsina EDTA para degradar la consolidación gp120-His en la superficie, pero no internalizado. A partir de entonces, extractos citosolicos y celulares pueden ser analizados por la presencia de gp120-His por borrones de Western, ya sea usando un anticuerpo monoclonal al His-tag o directamente a la proteína gp120. Después de una absorción eficaz de la gp120-His, gp120 es expresado junto con antígenos modelos (es decir, proteínas de la envoltura del virus sincitial respiratorio bovino o la proteína E2 del virus de diarrea viral bovina) el cual será usado para realizar nuevos estudios (en aras de simplicidad, este producto se denomina gp120-Ag).

Ejemplo 2

Mejorar el desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1 por el antígeno de pulso DC

Datos recientes enfatizan que la absorción de antígenos vía receptores de reconocimiento de patrones, tales como receptores Toll-like (TLR) o DC-SIGN, mejora notablemente el desarrollo de un tipo Th1 de respuesta inmune con IFN α y IL-12 siendo liberado por el antígeno DC pulsado. La liberación de estas citocinas favorece el desarrollo de una inmunidad mediada celular.

Un antígeno conocido para unirse a TLR es la proteína F del virus sincitial respiratorio (VSR), y esta unión lleva a la inducción de IL-12 ((Haeberle, HA *et al* (2002) J Infect Dis 186: 1199-1206; Haynes, LM *et al* (2001) J Virol 75: 10730-10737; y Kurt-Jones, EA *et al* (2000) Nat Immunol 1: 398-401). Como el VSR es la causa principal de las infecciones del tracto respiratorio en recién nacidos de varias especies incluyendo el ganado y los seres humanos, la proteína F VSR se usará en estos experimentos como el antígeno modelo.

Los vectores de expresión His-tag que contienen la gp120 del VIH (generado en el Experimento 1), la proteína F VSR (gentileza de la Dr Geraldine Taylor, Instituto de Sanidad Animal, Compton), o una proteína de fusión de gp120/proteína F (generados en el Experimento 1) son usados para transfectar células COS-7. Después de 72 horas, proteínas His-tagged son cosechados del sobrenadante de células así como las células lisadas usando níquel-agarosa, y su presencia analizados por borrones de Western usando anticuerpos anti-His.

Para demostrar el efecto de la gp120-His, proteína F-His o gp120-Ag en DC bovina, células son incubadas durante 2 horas con diferentes dosis de cada proteína purificada. Después de este tiempo, los supernadantes son cosechados y analizados para la presencia de IFN α , IL-10 y IL-12 usando sistemas ELISA (Werling, D *et al* (2004) Inmunología 111: 41-52).

ES 2 356 344 T3

Resultados

Se espera que la cantidad de IFN α y IL-12 liberado por DC expuestos a gp120-His o gp120-Ag debería ser mayor que la producida por los linfocitos de sangre periférica o macrófagos expuestos por el mismo tiempo y cantidad a gp120-His. Además, se espera que gp120-His por sí solo resultara en la producción de IL-10, la proteína F-His resultara principalmente en la producción de IL-12, y el gp120-Ag resultara en una liberación muy fuerte de IL-12.

Ejemplo 3

Estimulación de células T naive de DC

En contraste a otras células presentadoras de antígeno (APC), tales como macrófagos y células B, DC tienen la capacidad única de estimular células T naive y estimular una respuesta de la célula T de memoria mucho mas fuerte (Werling *et al* (1999); Werling, D *et al* (2002) J Leukoc Biol 72: 297-304). Para evaluar la capacidad estimuladora de la gp120-Ag DC pulsado, y si son capaces de estimular naive así como células T de memoria, diferentes subconjuntos de APC son generados (Werling *et al* (2002) y incubado con gp120-Ag durante periodos diferentes de tiempo (0-6 horas). Después de este tiempo, DC son inactivados por la exposición a la mitomicina-D y añadidos en varias relaciones ordenadas de células T CD4+ del mismo donante. Después de 5 días en cultivo, la capacidad estimuladora de la gp120-Ag DC pulsado, macrófagos y células B son evaluados midiendo la cantidad de timidina etiquetada [3 H] incorporado en el ADN de la proliferación de células T por recuento de centelleo líquido usando un contador beta.

Experimentos similares son realizados usando APC y células T generados del VSRB de bovinos inmunizados, así evaluando las propiedades de subconjuntos APC para estimular una respuesta de células T de memoria (acceso a existentes animales inmunizados vía la Dr Geraldine Taylor, Instituto de Sanidad Animal, Compton).

Resultados

Se espera que fuerte proliferación de células T sea observada solo en la presencia de DC, y no de macrófagos o células B (los cuales muestran una respuesta 10 veces menor).

También se espera que solo DC pulsados con gp120-Ag estimularan la proliferación de células T naive y inducirán a una respuesta proliferativa 10 veces mas fuerte que otro APC cuando se co-cultivo con células T del VSRB de animales inmunizados.

Ejemplo 4

Endocitosis de DC-SIGN como resultado de la unión del VIH-1

En el sistema humano, endocitosis de DC-SIGN como resultado de la unión del VIH-1 disminuye el número de moléculas DC-SIGN en la superficie DC. Específicos anticuerpos monoclonales anti-DC-SIGN son formulados en el ratón por métodos estándares o anticuerpos policlonales anti-DC-SIGN son formulados en el conejo por métodos estándares, y son probados por si estos interfieren con la gp120-Ag o la gp120-His uniéndose a DC-SIGN. Un anticuerpo de no interferencia y un anticuerpo anti-ratón secundario fluorescente etiquetado son usados para calcular la expresión DC-SIGN en la superficie de DC (pulsado con gp120-Ag medio o el sobrenadante de células COS-7 transfectadas con un plásmido vacío, como controles negativos) con la ayuda de la Clasificación de Fluorescencia de Células Activadas (CFCA). La medición se repite en un grupo similar de DC después de pulsar con gp120-Ag o gp120-His durante 2 horas (grupo Experimental).

Cantidad suficiente de gp120-Ag debería ser usado para incrementar la probabilidad de unión de DC-SIGN y internalización.

Resultados

Si la cantidad de superficie DC-SIGN en el grupo experimental es similar a la del grupo de control, se espera que probablemente que endocitosis no significativa de DC-SIGN ocurra, apoyando así la teoría que el antígeno limitado DC-SIGN es protegido de la degradación, y no es procesado. Si la superficie de expresión DC-SIGN se reduce a la unión gp120-Ag, DC-SIGN es mas probable endocitosis por DC, y por tanto será entregado subsecuentemente a los compartimientos de endocitosis dentro de la célula, la cual permite el procesamiento de la proteína por su posterior presentación a las células T vía moléculas MHC clase II (y MHC clase I). Esto resultara en una posterior respuesta proliferativa de células T.

Es necesario que se produzca una endocitosis para que se produzca una respuesta inmune.

El bloqueo de DC-SIGN debe reducir la absorción de la gp120-His, pero no de otras moléculas.

ES 2 356 344 T3

Potenciales grupos de control útiles incluyen DC con no superficie DC-SIGN, por ejemplo como resultado de un tratamiento breve de tripsina, y un agente que causa la endocitosis de DC-SIGN (control positivo).

5 Ejemplo 5

Efectos de la inmunización ap120-Ag en animales

10 Para demostrar el efecto de una inmunización gp120-Ag en animales, el ganado es inmunizado con diferentes dosis de gp120-Ag, y el desarrollo de una respuesta de anticuerpo ya sea un antígeno como la proteína F o gp120 es analizado usando sistemas ELISA disponibles para el Ag específico. Adecuados sistemas ELISA están disponibles comercialmente para gp120 y para la proteína F-VSR. Cuatro grupos de animales son inmunizados ya sea con la solución portadora sola, gp120-His purificado, proteína F-His purificado, o gp120-Ag. Muestras de sangre son tomadas en una base semanal antes y después de la inmunización, y el título de anticuerpos medido en muestras de sueros.

15 *Resultados*

Se espera que los animales inmunizados con la gp120-Ag desarrollara anticuerpos tanto para la gp120 como para el Ag de interés, como la proteína F. Para estimar la relación entre anticuerpos Ag específicos y anticuerpos gp120 20 específicos, el título de anticuerpo de animales inmunizados con la gp120-His servirá como control, estableciendo así los datos para demostrar la eficiencia de gp120-Ag siendo tomadas y presentadas.

Normalmente, el título de anticuerpos para gp120 en animales inmunizados con la gp120-Ag pueden ser usados como un indicador directo para la inmunización exitosa de un animal, y también permitirá la discriminación de animales 25 inmunizados versus animales infectados naturalmente.

Ejemplo 6

30 *Desafiando con éxito los animales inmunizados con el antígeno*

Habiendo establecido la inmunización con éxito de animales, los mismos grupos de animales son impugnados con el antígeno, como la proteína F VSR (o de todo el VSR) y el desarrollo de signos clínicos monitoreadas.

35 *Resultados*

Como la proteína F es uno de los antígenos principales de un VSR, se espera que los animales inmunizados deban tener protección contra la impugnación posterior y no deban desarrollar los síntomas clínicos, considerando que los animales que recibieron la gp120-His o la solución portadora deban hacerlo.

40

Ejemplo 7

45 *Obtención de secuencias de ADNc del DC-SIGN bovino*

Células dendríticas bovinas fueron aislados según el procedimiento en Werling *et al* (2002) J. Leukoc. Biol. 72, 297-304, y el ARNm aislado. Un kit de amplificación de ADNc SMARTTM RACE de Becton Dickinson (Cat. No. K1811-1) se uso para amplificar el ADNc usando una cartilla elemental TAGCTGACTCCTTGCCAAGTC (SEQ ID NO: 14). El ADNc amplificado, denominada variante 1, fue secuenciado y la secuencia de nucleótidos es dada en la 50 Figura 1.

Otra secuencia parcial de ADNc del DC-SIGN bovina fue obtenido, denominado variante 2, usando cartillas elementales degeneradas sobre la base de homología compartida entre la molécula DC-SIGN murino y humano (Acceso a la Genoteca Nos. AF373408 y NM_021155 respectivamente). La secuencia de ADNc parcial de la variante 2 del 55 DC-SIGN bovino es dada en la Figura 6.

Ambas secuencias de código de la variante de ADNc del DC-SIGN bovina para un receptor de lectina tipo-C y comparten hasta 89% de homología en el par de bases y/o secuencia de aminoácidos con el murino correspondiente y secuencias de humano (Figura 7).

60

Figura 7 muestra una alineación Clustal W de las secuencias de aminoácidos del DC-SIGN humano (NM_021155_AA), DC-SIGN murino (muDC-SIGN_AA), y las dos variantes del DC-SIGN bovino (boDC-SIGN variante 1/2_AA). Guiones indican ausencia de residuos coincidentes.

65

ES 2 356 344 T3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para la vacunación de un animal que comprende (i) una fracción seleccionada de gp120 del VIH, la proteína LAM de *Mycobacterium tuberculosis* o una glicoproteína del virus de Ébola, o una parte de las mismas que se une a DC-SIGN en una célula dendrítica y es mayor que 10 aminoácidos en longitud; y (ii) un antígeno.
2. Un compuesto según la reivindicación 1 donde el antígeno es un polipéptido.
3. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el antígeno es un componente antigénico de un patógeno o un tumor, o, un antígeno príon.
4. Un compuesto según la Reivindicación 3 donde el antígeno comprende dos o más de un componente antigénico de un patógeno o un tumor, o, un antígeno príon.
5. Un compuesto según la Reivindicación 3 o 4 donde el antígeno es una variante antigénica de un componente antigénico que tiene hasta 5% de sustituciones.
6. Un compuesto según las Reivindicaciones 3 - 5 donde el patógeno es cualquiera de una bacteria, virus, hongos, protozoos o helmintos.
7. Un compuesto según la Reivindicación 6 donde el antígeno es un componente antigénico de un patógeno asociado con la fiebre aftosa, la enfermedad vesicular porcina, peste de pequeños rumiantes, dermatosis nodular contagiosa, lengua azul, peste equina africana, peste porcina clásica, enfermedad de Newcastle, estomatitis vesicular, peste bovina, perineumonía contagiosa bovina, fiebre del valle Rift, viruela ovina y caprina, la peste porcina africana, y la influenza aviar altamente patógena o una variante de dicho componente que tiene hasta 5% de sustituciones.
8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la fracción y el antígeno están unidos covalentemente.
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la fracción y el antígeno, cada uno comprende un polipéptido y ambos están presentes en la misma cadena de polipéptido.
10. Un molécula de ácido nucleico que codifica un compuesto según la Reivindicación 9.
11. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según la Reivindicación 10.
12. Una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico según la Reivindicación 10 o un vector de expresión según la Reivindicación 11.
13. Una vacuna que comprende un compuesto según cualquiera de las Reivindicaciones de 1 a 9 o una molécula de ácido nucleico según la Reivindicación 10.
14. Una vacuna según la Reivindicación 13 que comprende además un adyuvante.
15. Un compuesto según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 o una molécula de ácido nucleico según la Reivindicación 10 para su uso en la medicina.
16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 o una molécula de ácido nucleico según la Reivindicación 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
17. Uso de un compuesto según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 o un ácido nucleico según la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para combatir una enfermedad en un animal.
18. Uso de un compuesto según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 o un ácido nucleico según la Reivindicación 10 en la fabricación de una vacuna para la inmunización de un animal.
19. Uso según la Reivindicación 17 o 18 donde la enfermedad es una causada por un patógeno.
20. Uso según la Reivindicación 19 donde el patógeno es cualquiera de una bacteria, virus, hongos, protozoos o helminto.
21. Uso según la Reivindicación 20 donde el patógeno es uno asociado con la fiebre aftosa, la enfermedad vesicular porcina, peste de pequeños rumiantes, dermatosis nodular contagiosa, lengua azul, peste equina africana, peste porcina clásica, enfermedad de Newcastle, estomatitis vesicular, peste bovina, perineumonía contagiosa bovina, fiebre del valle Rift, viruela ovina y caprina, la peste porcina africana, y la influenza aviar altamente patógena.
22. Uso según la Reivindicación 17 o 18 donde el animal es un mamífero.

ES 2 356 344 T3

23. Uso según la Reivindicación 17 o 18 donde el animal es una animal de compañía o un animal de granja.

24. Uso según la Reivindicación 22 o 23 donde el animal es una vaca, oveja, caballo, cerdo, cabra, perro, gato o conejo.

25. Un método de fabricación de un compuesto según la Reivindicación 1 comprendiendo enlazar dicha fracción y dicho antígeno.

26. Un método de fabricación de un compuesto según la Reivindicación 9 el cual comprende un polipéptido, dicho método comprendiendo (i) cultivar de una célula huésped según la Reivindicación 12 que expresa dicho polipéptido y (ii) aislar dicho polipéptido.

27. Un método de fabricación de un ácido nucleico según la Reivindicación 10 comprendiendo el enlace de una molécula de ácido nucleico que codifica la fracción y una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno.

28. Un método para determinar si a un animal se ha administrado un compuesto según la Reivindicación 1, el método comprendiendo determinar en una muestra conteniendo anticuerpos tomada del animal, si el animal ha tenido una respuesta inmune a la fracción en el compuesto según la Reivindicación 1.

29. Un método según la Reivindicación 28 que comprende el paso adicional de determinar si el animal ha tenido una respuesta inmune al antígeno presente en dicho compuesto.

30. Un kit de partes que comprende (i) un compuesto según cualquiera de la Reivindicaciones 1 a 9 o una molécula de ácido nucleico según la Reivindicación 10 y (ii) medios para la detección de una respuesta inmune a la fracción presente en dicho compuesto y/o (iii) medios para la detección de una respuesta inmune al antígeno presente en dicho compuesto.

31. Un kit de partes según la Reivindicación 30 en donde si está presente la parte (ii) comprende todos, o una porción mayor que 10 residuos de aminoácidos de longitud, de dicha fracción que se une a un anticuerpo aparecido contra dicha fracción y la parte (iii) comprende todos, o una porción de al menos 5 aminoácidos de longitud, de dicho antígeno que se une a un anticuerpo aparecido contra dicho antígeno.

32. Un kit de partes que comprende (i) medios para la detección de una respuesta inmune a un antígeno de enfermedad animal y (ii) medios para la detección una respuesta inmune a una fracción seleccionada de la gp120 del VIH, la proteína LAM de *Mycobacterium tuberculosis* o una glicoproteína del virus de Ébola, o una parte de la mismas que se une a DC-SIGN en una célula dendrítica y es mayor que 10 aminoácidos en longitud.

33. Un kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32 donde el medio para la detección de una respuesta inmune es un ELISA.

FIGURA 1

ctccttqtcc aagtqtccaa ggtccccagn tccntaagtc aggaacaatc canqcaagac	60
gcgatctacc agaacctgac ccagcttaaa gctgcagtgg gtgagctctc agagaaatcc	120
aagctgcagg agatctacca ggagctgacc cagctgaagg ctgcagtggg tgagcttcca	180
gagaaatena agcagcagga gatctaccag gagctgaccc ggctgaaggc tgcagtgggt	240
gagcttccag agaaatcnaa gctgcaggag atctaccagg agctgaccng gctgaaggct	300
gcagtgggtg agcttccaga gaaatctaaq atgcaggaga tctaccagga gctgacnagg	360
ctgaaggctg cagtgggtga gctcccagag aaatctaaqc agcaggagat ctaccaggag	420
ctgaccgggc tgaaggctgc agtgggtgag ctaccagaga aatctaaqca gcaggagatc	480
taccaggagc tgaccgggct gaaggctgca gtgggtgagc ttccagataa atccaagcag	540
caggagatct accaggagct gaccagctg aaggctg	577

FIGURA 2 (Pagina 1 de 4)

Resultados de Alineamiento

Alineamiento : Alineamiento de ADN de formas multiples
 Parametros : Matriz de recuento : Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Numero de secuencias a alinear: 5

Pos	Secuencia	Comienzo	Fin	Longitud	Coincidencias	Coincidencias
1	Chimp_DC-SIGN	1	1212	1212	1203	99
2	Pan troglodytes	1	1212	1212	1203	99
3	huDC-SIGN_CDS	1	1215	1215	1203	99
4	Macaca mulatta_CDS	1	1215	1215	1193	93
5	ms_DC-SIGN.txt	1	1450	1450	670	44

FIGURA 2 (Pagina 3 de 4)

Chimp DC-SIG 456 gctgaaggctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagatgcaggagatctaccagga
Pan troglody 456 gctgaaggctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagatgcaggagatctaccagga
huDC-SIGN CD 456 gctgaaggctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagatgcaggagatctaccagga
Macaca mulat 456 gctgaaggctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagatgcaggagatctaccagga
mu_DC-SIGN.t 506 aagagaggctacacttggatggggctcattgacat----gagcaggag-tctacaggt

Chimp DC-SIG 516 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Pan troglody 516 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
huDC-SIGN CD 516 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Macaca mulat 516 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
mu_DC-SIGN.t 561 acggggtagatggttcaactctgactctcagtttcagtaagtattggagta-aagagata

Chimp DC-SIG 576 e-taaca-----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
Pan troglody 576 e-taaca-----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
huDC-SIGN CD 576 e-taaca-----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
Macaca mulat 576 e-taaca-----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
mu_DC-SIGN.t 620 e-taagaacctggagagggaagactgtgcagagttcagagatgacggctggaaatgacacc

Chimp DC-SIG 612 -----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
Pan troglody 612 -----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
huDC-SIGN CD 612 -----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
Macaca mulat 612 -----ggaactga-----ccggctgaaggctgcagtggg---
mu_DC-SIGN.t 680 aatgtagaaagagagatttggatctgcaaaagcttcaactccggcctagcaag

Chimp DC-SIG 665 tgaaggc-----tgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagatct-
Pan troglody 665 tgaaggc-----tgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagatct-
huDC-SIGN CD 665 tgaaggc-----tgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagatct-
Macaca mulat 665 tgaaggc-----tgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagatct-
mu_DC-SIGN.t 740 tgaaggc-----tgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagatct-

Chimp DC-SIG 716 -accaggagctgaocagctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Pan troglody 716 -accaggagctgaocagctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
huDC-SIGN CD 716 -accaggagctgaocagctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Macaca mulat 716 -accaggagctgaocagctgagctgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
mu_DC-SIGN.t 800 taccatagctatgccagtttattctacttgtctgtgaccattgataaccttgacaagat

Chimp DC-SIG 771 ctgggaatggacattcttccaaggaaactgttacttcatgtctaactcccagcgggaactg
Pan troglody 771 ctgggaatggacattcttccaaggaaactgttacttcatgtctaactcccagcgggaactg
huDC-SIGN CD 771 ctgggaatggacattcttccaaggaaactgttacttcatgtctaactcccagcgggaactg
Macaca mulat 771 ctgggaatggacattcttccaaggaaactgttacttcatgtctaactcccagcgggaactg
mu_DC-SIGN.t 860 ctgggaatggacattcttccaaggaaactgttacttcatgtctaactcccagcgggaactg

Chimp DC-SIG 831 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Pan troglody 831 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
huDC-SIGN CD 831 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Macaca mulat 831 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
mu_DC-SIGN.t 914 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat

Chimp DC-SIG 856 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Pan troglody 856 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
huDC-SIGN CD 856 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Macaca mulat 856 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
mu_DC-SIGN.t 974 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat

Chimp DC-SIG 900 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Pan troglody 900 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
huDC-SIGN CD 900 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Macaca mulat 900 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
mu_DC-SIGN.t 1034 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat

Chimp DC-SIG 942 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Pan troglody 942 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
huDC-SIGN CD 942 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
Macaca mulat 942 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat
mu_DC-SIGN.t 1094 gctgactggctgaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcaggagagat

FIGURA 3 (Pagina 1 de 2)

```

putative boDC-SIGN
Chimp_DC-SIGN
huDC-SIGN_CDS
Macaca mulatta_CDS
-----LLV-----
MSDSKEPRLQQLGLLEEEQLRGLGFRQNRGYKSIAGCLGHGPLVLQLLSFTLLAGLLV--
MSDSKEPRLQQLGLLEEEQLRGLGFRQNRGYKSIAGCLGHGPLVLQLLSFTLLAGLLV--
MSDSKEPRLQQLDLLEEEQLGGVGFRTQTRGYKSIAGCLGHGPLVLQLLSFTLLAGLLV--

putative boDC-SIGN
Chimp_DC-SIGN
huDC-SIGN_CDS
Macaca mulatta_CDS
-----QVSKVPSS*SQE--QS*QDAIYQNL-----
-----QVSKVPSSISQE--ESRQDVIYQNL-----
-----QVSKVPSSISQE--QSRQDAIYQNL-----
-----QVSKVPSSLSQG--QSKQDAIYQNL-----

putative boDC-SIGN
Chimp_DC-SIGN
huDC-SIGN_CDS
Macaca mulatta_CDS
-----TQLKAAVG-----ELSEKSKLOEIYQE-----LTQLKAAVGEPEK*-
-----TQLKAAVG-----ELSEKSKLOEIYQE-----LTQLKAAVGEPEKS-
-----TQLKAAVG-----ELSEKSKLOEIYQE-----LTQLKAAVGEPEKS-
-----TQLKVAVS-----ELSEKSKQEIYQE-----LTRLKAAVDELPEKS-

putative boDC-SIGN
Chimp_DC-SIGN
huDC-SIGN_CDS
Macaca mulatta_CDS
-----KQEIYQEL-----KQEIYQEL
-----KQEIYQEL-----KQEIYQEL
-----KLQEIYQEL-----KLQEIYQEL
-----KQEIYEBL-----KQEIYEBL

putative boDC-SIGN
Chimp_DC-SIGN
huDC-SIGN_CDS
Macaca mulatta_CDS
-----EY-QELT*LKAAVGELP-----EY-QELT*LKAAVGELP--
-----EY-QELTRLKAAVGELP-----EY-QELTRLKAAVGELP--
-----EY-QELTWLKAAVGELP-----EY-QELTWLKAAVGELP--
-----EY-QELTWLKAAVGELP-----EY-QELTWLKAAVGELP--

putative boDC-SIGN
Chimp_DC-SIGN
huDC-SIGN_CDS
Macaca mulatta_CDS
-----EKSKMQEIYQEL*R-LKAAVGE*P-----EKSKMQEIYQEL*R-LKAAVGE*P
-----EKSKMQEIYQELTR-LKAAVGE*P-----EKSKMQEIYQELTR-LKAAVGE*P
-----EKSKMQEIYQELTR-LKAAVGE*P-----EKSKMQEIYQELTR-LKAAVGE*P
-----EKSKMQEIYQELSR-LKAAVGDLP-----EKSKMQEIYQELSR-LKAAVGDLP

```

FIGURA 3 (Pagina 2 de 2)

putative boDC-SIGN	EKSKQOE-----IYQELTR-----
Chimp_DC-SIGN	EKSKQOE...IYQELTR...IYQELTR...IYQELTR
huDC-SIGN_CDS	EKSKQOE-----IYQELTR-----
Macaca mulatta_CDS	EKSKQOE-----IYQELTR-----
putative boDC-SIGN	LKAAVGE*PEKS-----KQEIYQELT*LKAAVGE*LP**...KQOE-----
Chimp_DC-SIGN	LKAAVGE*PEKS-----KQEIYQELTR*LKAAVGE*LP---EKSKQOE-----
huDC-SIGN_CDS	LKAAVGE*PEKS-----KQEIYQELTR*LKAAVGE*LP---EKSKQOE-----
Macaca mulatta_CDS	LKAAVGD*PEKS-----KQEIYQELT*QLKAAVGD*LP...DRSKQQR-----
putative boDC-SIGN	-----IYQELTQLKA-----
Chimp_DC-SIGN	-----IYQELTQLKAAVERLCRRCPW
huDC-SIGN_CDS	-----IYQELTQLKAAVERLCRRCPW
Macaca mulatta_CDS	-----IYQELIQLKAAVERLCRRCPW
putative boDC-SIGN	-----
Chimp_DC-SIGN	EWTFQGCYFMSNSQRNWHDSITACKEVGAQLVVIKSAEEQNFLQLQSSRSNRFT*WGL
huDC-SIGN_CDS	EWTFQGCYFMSNSQRNWHDSITACKEVGAQLVVIKSAEEQNFLQLQSSRSNRFT*WGL
Macaca mulatta_CDS	EWTFQGCYFMSNSQRNWHDSITACKEVGAQLVVIKSAEEQNFLQLQSSRSNRFT*WGL
putative boDC-SIGN	-----
Chimp_DC-SIGN	SDLNEEGTWQVVDGSP*LL*PSFNQY*WNRGEP*NVH*VGE*DC*AE*F*SG*NG*W*H*DD*K*CN*L*AK*E*W*ICK
huDC-SIGN_CDS	SDLNQEGTWQVVDGSP*LL*PSFKQY*WNRGEP*NVH*VGE*DC*AE*F*SG*NG*W*H*DD*K*CN*L*AK*E*W*ICK
Macaca mulatta_CDS	SDLNHEGTWQVVDGSP*LL*PSFKQY*WNRK*GEP*NVH*VGE*DC*AE*F*SG*NG*W*H*DD*K*CN*L*AK*E*W*ICK
putative boDC-SIGN	-----
Chimp_DC-SIGN	KSAASCSRD*EE*Q*FL*SP*AP*AT*P*NP*PP*P*P*
huDC-SIGN_CDS	KSAASCSRD*EE*Q*FL*SP*AP*AT*P*NP*PP*P*P*
Macaca mulatta_CDS	KSAASCS*GD*E*E*RL*LS*P*AT*P*NP*PP*P*P*

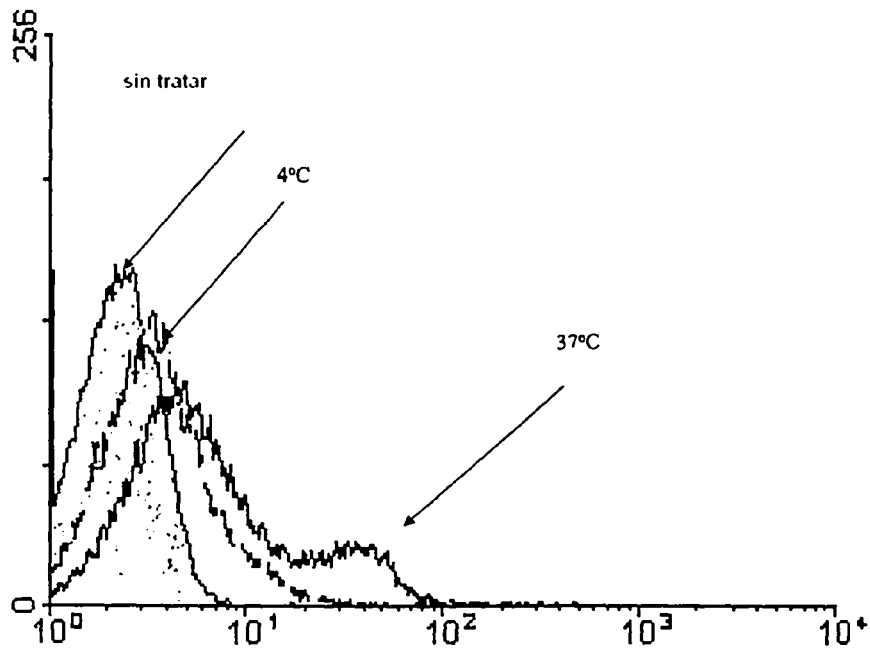


Fig. 4: Uniendo la gp120-FITC del VIH al DC bovino. Las células fueron dejadas sin tratar o incubadas a 4C o 37C con la gp120-FITC durante 60min. y analizado por citometria de flujo.

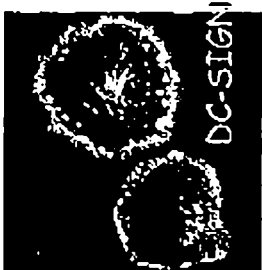
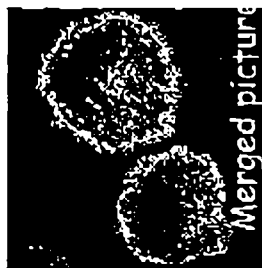
Macrófagos monocitos derivados de humanos

CPVL es una proteína interna que fue usado como un control de coloración positiva tal como se expresa en casi todas las células.



MoDC Humanos

Estas células fueron analizadas después de la coloración para mostrar la localización de DC-SIGN en la superficie así como junto al núcleo, posiblemente parecido al aparato de Golgi.



MoDC bovino

En contraste con MoDC humanos, estas células se coloran muy heterogénea

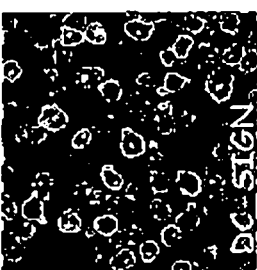
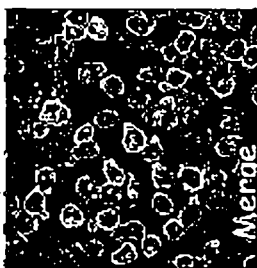


Figura 5: Patrón de coloración de Macrófagos monocitos derivado de humanos, células dendríticas monocitos derivado de humanos y células dendríticas monocitos derivado de bovino con un anticuerpo policlonal formulado en contra de la molécula DC-SIGN humana.

FIGURA 6

gagatgtatg aacacaagga gccagatgac tctgaggagg agacatttgg gggccagaga	60
ctggctgaga gacaccctcg accactacac agtttgagga gcttgtcaga gtgtctgacc	120
tggggcctc tgcttctct gctgtctctc ttcgtctcac tgggcttctt cacgctccag	180
ctgaccactc tggttcaagt ttccaggatc cagtgtctgc agagagattc gggagaccgt	240
gagaacaaca gcctggataa gtggctggac accaggttcc ggagtctgac tgaagttgca	300
gagaagcaga tgcaatcaaa cctggagaag atcctacagc gcctgaccgg gatgaatgcc	360
accctggctg gcctgtgcca tccttgtcct cagaattggg agtttttcga tggaagctgc	420
tacttcttct cctggacceca gagtgactgg agatctgccc tctctgcctg tctgcttatt	480
ggggccaacc tagttatcat cgagagtact gaggaggaga aattcctgaa cttttggtat	540
cccagaaata ataaaccac ctggatcggc ctccagtacc accacagtga gggttcctgg	600
cggtgggtgg atgacagtcc tgcacaactc agcttctgga aaaaagggga gcccaacaac	660
cacggagatg aggactgtgt ggaactgcac aacgatggct ggaatgatgg cagatgtgtt	720
acagaaaacc cctggatctg tgagaagccc tcg	753

