



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 887**

51 Int. Cl.:
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02733782 .3**
96 Fecha de presentación : **14.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1363663**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54 Título: **Inmunización de las mucosas con ácido nucleico.**

30 Prioridad: **12.01.2001 US 261554 P**
27.11.2001 US 333861 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, Inc.
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Vajdy, Michael;**
Polo, John;
Dubensky, Thomas, Jr. y
O'Hagan, Derek

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 887 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

Inmunización de las mucosas con ácido nucleico.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere en líneas generales a la inmunización de las mucosas, por ejemplo, la inmunización de las mucosas usando sistemas de suministro de genes. En particular el suministro a las mucosas de vectores deficientes en la replicación y/o vectores y partículas alfavirales recombinantes. Adicionalmente, también se describe el uso de estos sistemas para inducir potentes respuestas inmunes locales y sistémicas en las mucosas siguiendo diversas vías de inmunización de las mucosas.

Antecedentes de la invención

- 10 Sería deseable el desarrollo de vacunas que provoquen inmunidad en las mucosas contra diversos patógenos. Muchos patógenos causantes de enfermedad se transmiten a través de las superficies mucosas. Por ejemplo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) está reconocido como una de las mayores amenazas contra la salud que está encarando la medicina moderna y la transmisión sexual en todo el mundo del VIH es la causa principal del SIDA. Hasta ahora no hay curas o vacunas para el SIDA.

- 15 En 1983-1984, tres grupos identificaron independientemente el agente etiológico sospechoso del SIDA. Véase, por ejemplo, Barre-Sinoussi y col. (1983) Science 220:868-871; Montagnier y col., en Human T-Cell Leukemia Viruses (Gallo, Essex&Gross, eds., 1984); Vilmer y col. (1984) The Lancet 1:753; Popovic y col. (1984) Science 224:497-500; Levy y col. (1984) Science 225:840-842. Estos aislados se llamaron de forma variada virus asociado a linfadenopatía (VAL), virus linfotrópico de células T humanas tipo III (VLTH-III), o retrovirus asociado al SIDA (ARV).
 20 Todos estos aislados son cepas del mismo virus, y posteriormente se llamaron colectivamente virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Con el aislamiento de un virus causante del SIDA relacionado, las cepas originalmente llamadas VIH se llaman ahora VIH-1 y el virus relacionado se llama VIH-2. Véase, por ejemplo, Guyader y col. (1987) Nature 326:662-669; Brun-Vezinet y col. (1986) Science 233:343-346; Clavel y col. (1986) Nature 324:691-695. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de composiciones y procedimientos
 25 adecuados para tratar y/o prevenir en el mundo la infección por VIH.

- Se ha accedido a una gran cantidad de información acerca del virus VIH, y se han examinado varias dianas para el desarrollo de vacunas incluyendo los productos génicos *env*, *Gag*, *pol* y *tat* codificados por VIH. También se ha descrito la inmunización con polinucleótidos que codifican VIH nativos y sintéticos, como se describe por ejemplo, en el documento PCT/US99/31245 del mismo propietario que la presente y referencias citadas en el mismo. Además,
 30 se han administrado polinucleótidos que codifican VIH en diversos intentos por identificar una vacuna. (Véase, por ejemplo, Bagarazzi y col. (1999) J. Inject. Dis. 180:1351-1355; Wang y col. (1997) Vaccine 15:821:825). Se ha administrado un vector del alfavirus de la encefalitis equina venezolana (VEE) competente para la replicación que porta el dominio matriz/cápsida de VIH que podía provocar respuestas CTL por vía subcutánea en animales (Caley y col. (1997) J. Virol. 71:3031-3038). Además, los vectores alfavirales derivados del virus Sindbis también han
 35 demostrado provocar respuestas específicas para gag de VIH en animales. (Gardner y col. (2000) J. Virol. 74:11849-11857). Asimismo, también se han administrado péptidos VIH a sujetos animales (Staats y col. (1997) AIDS Res Hum Retroviruses 13:945-952; Belyakov (1998) J. Clin. Invest. 102:2072).

- También se han descrito vectores alfavirales recombinantes y sistemas de vector eucariota estratificado basado en alfavirus. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.015.686; 6.015.694; 5.843.723). Hariharan y
 40 col. (1998) J. Virol. 72:950-958 informaron de que una única inmunización intramuscular con vectores pSIN que expresan la glucoproteína B del virus del herpes simple (VHS) tipo I inducía un amplio espectro de respuestas inmunes, incluyendo anticuerpos específicos de virus, células T citotóxicas, y protección contra la estimulación letal del virus en dos modelos murinos diferentes. Polo y col. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4598-4603 informaron de una protección similar en modelos de estimulación con VHS después de la inmunización con partículas de
 45 vectores del replicón SIN en lugar de vectores del plásmido pSIN. Tsuji y col. (1998) J. Virol. 72:690-697 informaron que la administración subcutánea de SIN recombinante que expresa un epítipo de 9 unidades restringido al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I de la proteína del circumsporozoito *Plasmodium yoelii* o la nucleoproteína del virus de la influenza induce una gran respuesta de células T CD8(+) específicas de epítipo y proporciona un alto grado de protección contra la infección con el virus de la malaria o el virus de la influenza A.

- 50 La técnica anterior también incluye Immunology Letters, vol. 69, 1999, página 174. Esto describe replicones VEE que contienen el gen antigénico del virus de la influenza (HA) empaquetados en VLP de VEE, que después del suministro intranasal conducían a protección contra la estimulación intranasal con virus de la influenza virulento.

- Sin embargo, a pesar de estos y otros estudios, no se ha definido suficientemente la utilidad de vehículos de
 55 suministro génico deficientes en la replicación para estrategias de inmunización de las mucosas que puedan proteger contra la estimulación en las mucosas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones y procedimientos dirigidos al tratamiento y prevención de diversos patógenos transmitidos por vía sexual.

Sumario de la invención

La invención proporciona una partícula de replicón de alfavirus deficiente en la replicación que contiene una construcción de vector alfaviral que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica al menos un primer antígeno o forma modificada del mismo, siendo capaz dicho primer antígeno o forma modificada del mismo de estimular una respuesta inmune en un sujeto cuando se administra por vía intranasal, donde dicha partícula de replicón de alfavirus deficiente en la replicación es una partícula alfaviral quimérica que contiene una construcción de vector del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) empaquetada con las glucoproteínas de envuelta del virus Sindbis (SIN), para su uso en un procedimiento terapéutico para tratar a un sujeto mamífero generando una respuesta inmune en un sujeto por administración intranasal. La invención también proporciona el uso de una partícula de replicón alfaviral deficiente en la replicación que contiene una construcción de vector alfaviral que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica al menos un primer antígeno o forma modificada del mismo, siendo capaz dicho primer antígeno o forma modificada del mismo de estimular una respuesta inmune en un sujeto cuando se administra por vía intranasal, donde dicha partícula de replicón alfaviral deficiente en la replicación es una partícula alfaviral quimérica que contiene una construcción de vector del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) empaquetada con glucoproteínas de envuelta del virus Sindbis (SIN), en la fabricación de un medicamento para tratar terapéuticamente a un sujeto mamífero generando una respuesta inmune en el sujeto por administración intranasal.

Sumario de la divulgación

En este documento se describen sistemas de suministro de genes (por ejemplo, vectores alfavirales recombinantes) que son adecuados para su uso en una diversidad de aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, inmunización de las mucosas. Indicado brevemente, la descripción se refiere a construcciones de vector y partículas que expresan antígenos asociados con uno o más patógenos de enfermedades de transmisión sexual, así como procedimientos para preparar y utilizar los mismos, particularmente en regímenes de inmunización protectores de las mucosas. Preferiblemente, los vectores son deficientes en la replicación, por ejemplo vectores alfavirales tales como los derivados de Sindbis. En este documento se demuestra que la protección específica de antígeno contra una estimulación después de la inmunización puede inducirse después de la administración a las mucosas de vehículos de suministro de genes (por ejemplo, vectores alfavirales) que expresan el antígeno.

En un aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para generar una respuesta inmune contra un antígeno. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende administrar a través de la mucosas a células diana de un sujeto, un vehículo de suministro de genes deficiente en la replicación (o vector) que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno (o forma modificada del mismo), donde el antígeno (o forma modificada del mismo) es capaz de estimular una respuesta inmune en el sujeto. En ciertas realizaciones, las células diana están en tejidos de las mucosas, locales y/o sistémicos. La administración a las mucosas puede ser, por ejemplo, administración intranasal, oral, intrarrectal, y/o intravaginal. Preferiblemente, para patógenos de transmisión sexual, la administración a las mucosas es por vía intrarrectal o intravaginal. En ciertas realizaciones, se obtiene al menos un antígeno, por ejemplo, de un patógeno de transmisión sexual tal como un patógeno bacteriano (por ejemplo, gonorrea, clamidia y sífilis) o un patógeno vírico (por ejemplo, VIH, VHB, VHS, VHC y VPH). En ciertas realizaciones, el o los antígenos provocan una respuesta inmune restringida al HLA de clase I y, opcionalmente, también provocan una respuesta inmune restringida al HLA de clase II.

En otros aspectos, los procedimientos incluyen el suministro de genes que codifican citoquinas, linfocinas, quimioquinas y similares potenciadoras del sistema inmune. Estos genes pueden insertarse en el mismo vehículo de suministro de genes que lleva el o los antígenos de interés (por ejemplo, partícula de replicón alfaviral) o pueden portarse sobre uno o más vehículos de genes diferentes. En ciertas realizaciones, el o los antígenos provocan una respuesta inmune restringida al HLA de clase I y, opcionalmente, también provocan una respuesta inmune restringida al HLA de clase II.

El vehículo (o vector) de suministro de genes puede ser, por ejemplo, un vector no viral, un vehículo particulado (por ejemplo, partículas de oro o tungsteno revestidas con el polinucleótido o suministradas usando una pistola génica); una preparación de liposomas; un vector viral; un viral retroviral, o un vector derivado de alfavirus. En ciertos aspectos, se usa un vector derivado de alfavirus, por ejemplo, un vector derivado del virus Sindbis, el virus Semliki Forest, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus Ross River o vectores quiméricos derivados de cualquiera de varios alfavirus diferentes (por ejemplo, quimeras SIN-VEE). Cualquiera de los vectores de suministro de genes descritos en este documento (por ejemplo, vector alfaviral) puede suministrarse, por ejemplo, a células presentadoras de antígeno (APC) tales como células dendríticas. En ciertas realizaciones, el sujeto y/o las células es un mamífero, por ejemplo un ser humano. En cualquiera de los procedimientos descritos en este documento, las células diana pueden infectarse *in vivo*. Además, en cualquiera de los procedimientos descritos en este documento, antes o después de la etapa de administración a las células diana, también puede administrarse una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína MHC de clase I o clase II, o combinaciones de las mismas, o una proteína seleccionada entre el grupo constituido por CD3, ICAM-1, LFA-3 o análogos de las mismas a las células diana. Adicionalmente, el vehículo de suministro de genes descrito anteriormente para la vacunación en las mucosas puede usarse en combinación con una o más composiciones inmunogénicas adicionales (vehículo de suministro de

genes, polipéptido, proteína, quimioquina, citoquina, etc.) en el que se suministran una o más composiciones adicionales por una o más vías a las mucosas o no a las mucosas.

Estos y otros aspectos de la presente descripción llegarán a ser evidentes después de una referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, a continuación se exponen diversas referencias que describen en más detalle ciertos procedimientos o composiciones (por ejemplo, plásmidos, etc.).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que representa respuestas CTL locales específicas para gag de VIH-1 en ganglios linfáticos cervicales después de inmunización intranasal con partículas de replicón SIN que expresan gag medidas en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . "--♦--" representa un primer grupo de animales SIN DC+; "■—" representa un segundo grupo de animales SIN DC+; "--□--" representa SIN DC-; "—♦—" representa un plásmido de control (con promotor CMV) suministrado por vía intramuscular.

La figura 2 es un gráfico que representa respuestas CTL sistémicas específicas de gag en el bazo después de administración intranasal con partículas de replicón SIN medidas en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . "--♦--" representa un primer grupo de animales SIN DC+; "■—" representa un segundo grupo de animales SIN DC+; "--□--" representa animales SIN DC-; "—●—" representa un plásmido de control (con promotor CMV) suministrado por vía intramuscular.

La figura 3 es un gráfico que representa varias células secretoras de $\text{INF-}\gamma$ en tejido linfático local y periférico después de inmunización intranasal con partículas SIN.

La figura 4 es un gráfico que representa respuestas CTL locales específicas de gag de VIH-1 en ganglios linfáticos ilíacos que drenan la mucosa rectal y vaginal después de administración intrarrectal (IR) o intravaginal (IVAG) de partículas de replicón SIN, medidas en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . "--♦--" representa respuestas en un primer grupo después de administración intrarrectal de SIN seguido por estimulación intrarrectal (IR) con virus vaccinia (VV); "■—" representa administración intravaginal de SIN seguido por estimulación intravaginal con VV; "—▲—" representa respuestas en un segundo grupo después de administración IR de SIN seguido por estimulación con VV; "—x—" representa un plásmido de control (con promotor CMV) suministrado por vía intramuscular.

La figura 5 es un gráfico que representa respuestas CTL sistémicas específicas de gag de VIH-1 en el bazo después de administración intrarrectal (IR) o intravaginal (IVAG) de partículas de replicón SIN, medidas en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . "--♦--" representa respuestas en un primer grupo de animales después de administración intrarrectal de replicones SIN seguido por estimulación intrarrectal con virus vaccinia (VV); "■—" representa administración intravaginal de SIN seguido por estimulación intravaginal con VV; "—■—" representa animales estimulados por vía intravaginal con VV sin inmunización; "—■—" representa respuestas en animales después de administración intrarrectal de replicones SIN seguido por administración intrarrectal de replicones SIN; "—●—" representa respuestas en animales después de administración intravaginal de replicones SIN seguido por administración intravaginal de replicones SIN; "—■—" representa respuestas en animales después de administración intranasal de replicones SIN seguido por administración intravaginal de replicones SIN.

La figura 6 es un gráfico que representa células secretoras de $\text{IFN-}\gamma$ en tejido esplénico después de inmunización intrarrectal (IR) e intravaginal (IVAG) con partículas SIN y estimulación IR e IVAG con virus vaccinia (VV).

La figura 7 es un gráfico que representa células secretoras de $\text{IFN-}\gamma$ en ganglios linfáticos ilíacos después de inmunización intrarrectal (IR) e intravaginal (IVAG) con partículas SIN y estimulación IR e IVAG con virus vaccinia (VV).

La figura 8 es un gráfico que representa el título de virus vaccinia (VV) después de suministro vaginal y rectal de partículas SIN-gag.

La figura 9 es un gráfico que representa los títulos séricos específicos de gag. De izquierda a derecha, las barras muestran los títulos en animales: sensibilizados con SIN-gag y sin refuerzo; sensibilizados con SIN-gag y reforzados con polipéptido p24 y adyuvante LTK63; animales vírgenes; y sin sensibilización pero posterior refuerzo con p24 y adyuvante LTK63.

La figura 10 es un gráfico que representa los títulos séricos específicos de gp120. De izquierda a derecha, las barras muestran los títulos en animales: sensibilizados con SIN-gp140 y sin refuerzo; sensibilizados con SIN-gag y reforzados con polipéptido gp124 y adyuvante LTK72 y CpG; animales vírgenes; y sin sensibilización pero posterior refuerzo con polipéptido gp140 y adyuvante LTK72 y CpG.

La figura 11, paneles A a D, son gráficos que representan la inducción de respuestas inmunes celulares locales y sistémicas después de inmunizaciones IN (A), IM (B), IR (C) e IVAG (D) con partículas SIN-gag seguido por estimulación IVAG con VV-gag. Las inmunizaciones IN e IM inducían cantidades varias veces superiores de células secretoras de $\text{IFN-}\gamma$ específicas de gag en VUM e ILN en comparación con las inmunizaciones IR e IVAG. Los ratones se inmunizaron 3 veces IN o IM con $2,5 \times 10^6$ partículas SIN-gag e IR o IVAG con 10^7 partículas SIN-gag, tres

semanas después se estimularon por vía vaginal con 10^7 pfu de VV-gag, y se sacrificaron 5 días después. Los resultados se muestran como la cantidad promedio de células secretoras de IFN- γ específicas de p7g por 10 millones de células mononucleares (MNC) de tres experimentos independientes $\pm$ DT.

La figura 12 representa la protección en los ovarios de la estimulación vaginal con VV-gag después de inmunizaciones vaginales o rectales con partículas SIN-gag. Los ratones se inmunizaron 3 veces IN o IM con $2,5 \times 10^6$ partículas SIN-gag e IR o IVAG con 10^7 partículas SIN-gag, tres semanas después se estimularon por vía vaginal con 10^7 pfu de VV-gag, y se sacrificaron 5 días después. Se recogieron los ovarios y se realizó un ensayo de pfu convencional para la determinación de los títulos de VV. Cada punto representa las cantidades de unidades formadores de placas por ovario/cada ratón. Como control, ratones vírgenes se estimularon con VV-gag y los ratones inmunizados con partículas SIN-gag se estimularon con VV-gp160 y en ambos casos fueron evidentes elevados títulos de pfu en los ovarios.

La figura 13 es un gráfico que representa la inducción de una respuesta inmunológica (medida por el ensayo ELISPOT de IFN- γ) seguido por inmunización intranasal con partículas de vector alfaviral. Los números reales representados por el gráfico de barras son los siguientes: las partículas del replicón SIN-gag dieron 1154 (± 499); las partículas de replicón VEE-gag 1530 (± 425); SIN/VEE-gag 140 (± 140); y VEE/SIN-gag 2586 (± 762).

Descripción detallada

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel y col. Eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters y Dalrymple, Fields Virology (2ª ed.), Fields y col. (eds.), B.N. Raven Press, Nueva York, NY.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la", incluyen referencias plurales salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más de dichos agentes.

Antes de exponer la invención, puede ser de ayuda para comprender la misma exponer primero las definiciones de ciertos términos que se usarán a partir de ahora en este documento.

"Transferencia génica" o "suministro génico" se refiere a procedimientos o sistemas para insertar de forma viable ADN de interés en una célula huésped. Dichos procedimientos pueden provocar la expresión transitoria de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos (por ejemplo, episomas), o la integración de material genético transferido en el ADN genómico de células huésped. Los vectores de expresión de suministro génico incluyen, aunque sin limitación, vectores derivados de alfavirus, poxvirus y virus vaccinia. Cuando se usan para inmunización, dichos vectores de expresión de suministro génico pueden mencionarse como vacunas o vectores de vacuna.

Las expresiones "deficiente en la replicación" e "incompetente para la replicación" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un vehículo de suministro génico tal como un vector viral, que no fabrica o propaga partículas víricas infecciosas adicionales después de administrarse a una célula diana. Como será evidente para los especialistas en la técnica, los polinucleótidos (por ejemplo, ARN) contenidos en el vector o partículas administradas pueden amplificarse o replicarse, sin embargo, no se forman nuevos vectores o partículas virales descendientes y no se propagan de una célula a otra después de la administración.

"Construcción de vector alfaviral" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una o unas secuencias o genes de interés. Como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 6.015.695; la patente de Estados Unidos Nº 6.015.686; la patente de Estados Unidos Nº 5.842.723, y el documento WO97/38087, la construcción de vector debe incluir una secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus, así como una o más secuencias que, cuando se expresan codifican proteínas no estructurales alfavirales biológicamente activas (por ejemplo, NSP1, NSP2, NSP3, y NSP4), y una secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa alfaviral. Además, la construcción de vector debe incluir una región promotora de unión vírica que puede, en ciertas realizaciones, modificarse para evitar, aumentar, o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico. El vector también puede incluir molécula o moléculas de ácido nucleico que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de partículas de vector viral viables, un promotor 5' que es capaz de iniciar la síntesis del ARN viral *in vitro* o *in vivo* a partir del ADNc, así como uno o más sitios de restricción, medios para la expresión de múltiples antígenos (por ejemplo, elemento IRES) y una secuencia de polieadenilación. Cualquiera de las secuencias que componen la construcción alfaviral puede obtenerse de uno o más alfavirus. Como molécula de ARN, la construcción de vector alfaviral también puede mencionarse como "replicón ARN".

"Casete de expresión de proteína estructural" se refiere a una molécula producida de forma recombinante que es capaz de expresar proteína o proteínas estructurales alfavirales. El casete de expresión debe incluir un promotor y una secuencia que codifica proteína o proteínas estructurales alfavirales. Finalmente, el casete de expresión puede incluir sitios de terminación de la transcripción, de reconocimiento de corte y empalme y de adición de poliadenilación.

Los promotores preferidos incluyen los promotores CMV y VA1RNA de adenovirus, así como promotores de la región de unión subgenómica alfaviral. Además, el casete de expresión puede contener marcadores de selección tales como Neo, SV2 Neo, higromicina, fleomicina, histidinol, y DHFR.

"Partícula alfaviral recombinante" se refiere a una cápsida que contiene una construcción de vector alfaviral. Preferiblemente, la cápsida alfaviral está contenida dentro de una bicapa lipídica, tal como una membrana celular, en la que las proteínas virales codificadas (por ejemplo, proteínas de envuelta) están incluidas. Una diversidad de vectores puede estar contenida dentro de la partícula alfaviral, incluyendo las construcciones de vector alfaviral de la presente invención. Además, la partícula alfaviral recombinante puede ser una quimera, que contiene elementos de varios alfavirus diferentes cualesquiera (por ejemplo, construcción de vector ARN de Sin con proteína de cápsida y/o envuelta de VEE). (Véase también, la patente de Estados Unidos N° 6.329.201 del mismo propietario que la presente).

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos aminoacídicos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares dentro de la definición. La definición abarca tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través mutaciones de los huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

Un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopes (lineales, conformacionales o ambos) que estimularan el sistema inmune de un huésped para crear una respuesta humoral y/o celular específica de antígeno. El término se usa de forma intercambiable con el término "inmunógeno". Normalmente, un epítipo de célula B incluirá al menos aproximadamente 5 aminoácidos pero puede ser tan pequeño como de 3-4 aminoácidos. Un epítipo de célula T, tal como un epítipo CTL, incluirá al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y un epítipo de célula T auxiliar al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Normalmente, un epítipo incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tal como, 9, 10, 12 ó 15 aminoácidos. El término "antígeno" indica tanto antígenos de subunidad (es decir, antígenos que están separados y son concretos de un organismo completo con el que el antígeno está asociado en la naturaleza), así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo o fragmentos de los mismos, y mimótopos peptídicos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también están abarcados en la definición de antígeno como se usa en este documento. Asimismo, también se incluye un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico *in vivo*, tal como en terapia génica y aplicaciones de inmunización con ADN, en la definición de antígeno de este documento.

Para propósitos de la presente invención, los antígenos pueden obtenerse de cualquiera de varios virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, como se describe más completamente a continuación. El término también propone cualquiera de los diversos antígenos tumorales. Preferiblemente, los antígenos se obtienen de un patógeno de transmisión sexual, por ejemplo, un virus o una bacteria. Además, para propósitos de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica, como se define en este documento. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los huéspedes que producen los antígenos.

Una "respuesta inmunológica" contra un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular contra un antígeno presente en la composición de interés. Para propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T citolíticas ("CTL"). Las CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y expresadas sobre las superficies de células. Las CTL ayudan a inducir y promover la destrucción de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan ayudando a estimular la función, y centran la actividad de células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmune celular" también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras de dichas moléculas producidas por células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluyendo las derivadas de células

T CD4+ y CD8+. Además, puede inducirse una respuesta de quimioquinas por diversos glóbulos blancos o células endoteliales en respuesta a un antígeno administrado.

Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado por la presentación de antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células está dirigida a, o cerca de, células que presentan antígeno en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno para permitir la protección futura de un huésped inmunizado.

La capacidad de un antígeno particular de estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por varios ensayos, tal como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, o por ensayo de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erikson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376. Procedimientos recientes para medir la respuesta inmune mediada por células incluye la medición de citoquinas intracelulares o la secreción de citoquinas por poblaciones de células T (por ejemplo, por técnica ELISPOT), o por medición de células T específicas de epítipo (por ejemplo, por la técnica de tetramero) (revisado por McMichael, A.J., y O'Callaghan, C.A., J. Exp. Med. 187(9):1367-1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M.G., y col., Immunol. Rev. 150:5-21, 1996; Lalvani, A., y col., J. Exp. Med. 18:859-865, 1997).

Por tanto, una respuesta inmunológica como se usa en este documento puede ser una que estimula la producción de CTL, y/o la producción o activación de células T auxiliares. También puede estimularse la producción de quimioquinas y/o citoquinas. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Por tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por células B; y/o la activación de células T supresoras, citotóxicas, o auxiliares y/o células T $\gamma\delta$ dirigidas específicamente contra un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o para mediar el anticuerpo-complemento, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un huésped inmunizado. Dichas respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica.

Una "composición inmunogénica" es una composición que comprende una molécula antigénica donde la administración de la composición a un sujeto provoca el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular contra la molécula antigénica de interés. La composición inmunogénica puede introducirse directamente en un sujeto destinatario, tal como por inyección, inhalación, vía oral, intranasal o cualquier otra vía de administración a las mucosas (por ejemplo, intrarrectal o intravaginal).

Por "vacuna de subunidad" se entiende una composición de vacuna que incluye uno o más antígenos seleccionados pero no todos los antígenos, derivados u homólogos a, un antígeno de un patógeno de interés tal como de un virus, bacteria, parásito u hongo. Dicha composición esta sustancialmente libre de células patogénicas intactas o partículas patogénicas, o el lisado de dichas células o partículas. Por tanto, una "vacuna de subunidad" puede prepararse a partir de polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados (preferiblemente sustancialmente purificados) del patógeno, u análogos de los mismos. El procedimiento para obtener un antígeno incluido en la vacuna de subunidad, por tanto, puede incluir técnicas de purificación convencionales, producción recombinante, o producción sintética.

Un "factor inmunomodulador" se refiere a una molécula, por ejemplo una proteína, que es capaz de modular una respuesta inmune. Los ejemplos no limitantes de factores inmunomoduladores incluyen linfocinas (también conocidas como citoquinas), tales como IL-6, TGF- β , IL-1, IL-2, IL-3, etc.); y quimioquinas (por ejemplo, proteínas secretadas tales como el factor inhibidor de macrófagos). Ciertas citoquinas, por ejemplo TRANCE, flt-3L, y una forma secretada de CD40L son capaces de potenciar la capacidad inmunoestimuladora de las APC. Los ejemplos no limitantes de citoquinas que pueden usarse solas o en combinación en la práctica de la presente invención incluyen, interleuquina-2 (IL-2), el factor de células madre (SCF), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-12 (IL-12), G-CSF, el factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), interleuquina-1 alfa (IL-1 α), interleuquina-11 (IL-11), MIP-1 γ , el factor inhibidor de leucemia (LIF), ligando c-kit, trombopoyetina (TPO), ligando CD40 (CD40L), la citoquina inducida por la activación relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRANCE) y el ligando flt3 (flt-3L). Las citoquinas están disponibles en el mercado de varios proveedores tales como, por ejemplo, Genzyme (Framingham, MA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R&D Systems e Immunex (Seattle, WA). Las secuencias de muchas de estas moléculas también están disponibles, por ejemplo, en la base de datos GenBank. Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que se usen las moléculas que tienen actividad biológica similar a las citoquinas de tipo silvestre o purificadas (por ejemplo, producidas de forma recombinante o mutantes de las mismas) y el ácido nucleico que codifica estas moléculas.

Por "sujeto" se entiende cualquier miembro del subfilo chordata, incluyendo, aunque sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; pájaros, incluyendo pájaros domésticos, salvajes y de caza tales como gallinas, pavos y otros pájaros gallináceos, patos, gansos, y similares. El término no indica una edad particular. Por tanto, se pretenden cubrir individuos tanto adultos como recién nacidos. El

sistema descrito anteriormente se pretende para su uso en cualquiera de las especies vertebradas anteriores, ya que los sistemas inmunes de todos estos vertebrados funcionan de forma similar.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente indeseable o indeseable de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo en una formulación o composición sin causar ningún efecto biológicamente indeseable o interactuar de un modo perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

A. SISTEMAS DE SUMINISTRO GÉNICO

1. Vectores y partículas alfavirales

Como se ha indicado anteriormente, la presente descripción se refiere a construcciones de vector alfaviral, partículas alfavirales que contienen dichas construcciones, así como procedimientos para fabricar y utilizar dichas construcciones de vector y partículas en inmunizaciones a las mucosas. El uso de partículas de replicón deficientes en la replicación basadas en alfavirus, como sistema de suministro de vacuna a las mucosas proporciona varias ventajas. Quizá el aspecto más importante de la inmunización con un vector de virus deficiente en la replicación es el control del producto génico en el sitio de inmunización. La inmunización con vectores replicantes, incluyendo los vectores basados en el alfavirus de la encefalitis equina venezolana (VEE) atenuado vivo presentado (Caley y col. (1997) J. Virol. 71:3031-3038; Davis y col. (1996) J. Virol. 70:3781-3787), provoca la diseminación del vector en todo el huésped. En contraste, la inmunización con un vector deficiente en la replicación provoca la expresión local, sin la propagación de vector descendiente recién propagado. Además, la deficiencia en la replicación reduce el riesgo de respuestas inflamatorias indeseadas en los sitios de inmunización (Villacres (2000) Virology, 270:54).

Los vectores alfavirales adecuados para su uso en la presente descripción pueden construirse por cualquier medio, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos N°: 6.015.686; 6.015.694; 5.789.245 y 5.842.723. En resumen, las secuencias que codifican alfavirus adecuados para su uso en la preparación de las construcciones y partículas de vector descritas anteriormente pueden obtenerse fácilmente dada la descripción proporcionada en este documento a partir de fuentes de origen natural, o de bancos de depósito (por ejemplo, la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Los ejemplos representativos de alfavirus adecuados incluyen Aura (ATCC VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), virus de la encefalomiелitis equina del este (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylgach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), virus Ross River (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinit (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), encefalomiелitis equina venezolana (ATCC VR-69), virus de la encefalomiелitis equina venezolana (ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalomiелitis equina del este (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), e Y-62-33 (ATCC VR-375). Las secuencias obtenidas de uno o más alfavirus pueden usarse en el mismo vector y/o partícula. En un aspecto preferido de la presente descripción, las secuencias que codifican alfavirus de tipo silvestre se obtienen de un virus Sindbis.

El vector alfaviral competente típicamente incluye ARN de autoamplificación (replicón) en el que uno o más de los genes proteicos estructurales del virus están reemplazados por uno o más genes de interés (por ejemplo, antígenos). Los vectores basados en ARN, incluyendo vectores alfavirales, también se conocen como "replicones" porque retienen las funciones de replicasa necesarias para la autoamplificación de ARN y la expresión de elevado nivel, y pueden introducirse *in vivo* después de la transfección con ADN plasmídico (Dubensky y col. (1996) J. Virol. 70:508-519) o infección con partículas tipo virus. Las construcciones de vector alfaviral también contienen típicamente regiones de unión viral inactivadas, en tándem, o modificadas. Otras modificaciones y procedimientos para construir vectores alfavirales adecuados se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.015.686 y el documento WO 97/38087.

El ARN del replicón de la construcción de vector alfaviral puede suministrarse directamente a las células diana por medios físicos o pueden empaquetarse primero en partículas. Generalmente, las proteínas estructurales necesarias para el empaquetado se suministran *in trans* por construcciones auxiliares o por líneas celulares de empaquetado. Las proteínas estructurales pueden ser homólogas (por ejemplo, derivadas del mismo alfavirus que la construcción de vector); heterólogas (por ejemplo, derivadas de un alfavirus diferente de la construcción de vector), e híbridas (por ejemplo, que contiene elementos de múltiples alfavirus). De forma importante, solamente el ARN del replicón se empaqueta en la partícula, ya que los ARN auxiliares típicamente carecen de la secuencia de empaquetado de acción *in cis* necesaria para la encapsidación. Por tanto, pueden generarse partículas alfavirales que infectan células diana en cultivo o *in vivo*, y pueden expresar el gen de interés a elevado nivel; sin embargo, son deficientes ya que carecen de las partes críticas del genoma alfaviral necesarias para producir partículas virales que pueden propagarse a otras células. De este modo, cuando el ARN del replicón se introduce en una célula huésped adecuada, se autoamplifica, y el gen de interés se expresa a partir del ARNm subgenómico. Sin embargo, no se ensamblan nuevas partículas de virión *in vivo* debido a la ausencia de genes de proteínas estructurales.

Aunque no se han realizado estudios comparativos entre los diversos replicones alfavirales, se sabe que existen diferencias en el tropismo celular natural. Por ejemplo, el VEE linfotrópico recientemente ha demostrado transducir DC murinas (MacDonald y col. (2000) J. Virol. 74:914-922), aunque SIN y SFV no son linfotrópicos. La infección de DC humanas se ha demostrado recientemente para alfavirus o sus vectores derivados (Gardner y col. (2000) J. Virol. 74:11849-11857; documento WO 00/61772). Gardner identificó variantes SIN que son altamente eficaces para su crecimiento en DC humanas inmaduras. El determinante genético del tropismo por DC humanas para la variante SIN se ha mapeado en una única sustitución aminoacídica de la glucoproteína E2, y usando esta información, pueden generarse partículas de replicón alfaviral que pueden usarse para dirigirse a DC humanas. La caracterización detallada de DC infectadas por replicón tanto *in vitro* como *in vivo* reveló que las células infectadas con replicón mantenían sus capacidades de desarrollo y de presentación de antígenos, lo que indica la utilidad potencial de los replicones SIN dirigidos a DC para aplicaciones de vacuna contra una enfermedad infecciosa y maligna.

2. Vehículos de suministro génico adicionales

Como se indica anteriormente, se ha demostrado que la inmunización genética a las mucosas provoca respuestas inmunes tanto locales como sistémicas. Sin embargo, las cuestiones de seguridad asociadas con los peligros de reversión e infección potencial limitan la utilidad de estos sistemas. Además, el vector basado en virus replicante puede propagarse rápidamente en todo el huésped desde el sitio de administración y causar respuestas inflamatorias indeseadas en otros sitios. Por lo tanto, la presente descripción describe sistemas de suministro genético basados en virus y no en virus que son deficientes en la replicación en el huésped y, por consiguiente, no albergan la posibilidad de revertirse a un estado infeccioso. Por tanto, la descripción se refiere a composiciones y procedimientos de inmunización en las mucosas usando cualquier vehículo de transferencia génica deficiente en la replicación.

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia génica en células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para sistemas de suministro génico. Las secuencias seleccionadas pueden insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante después puede aislarse y suministrarse a células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Se han descrito varios sistemas retrovirales (patente de Estados Unidos Nº 5.219.740; Miller y Rosman, BioTechniques (1989) 7:980-990; Miller, A.D., Human Gene Therapy (1990) 1:5-14; Scarpa y col., Virology (1991) 180:849-852; Burns y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 9:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin, Cur. Opin. Genet. Develop. (1993) 3:102-109).

También se han descrito varios vectores adenovirales. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del huésped, los adenovirus persisten de forma extracromosómica minimizando de este modo los riesgos asociados con la mutagénesis por inserción (Haj-Ahmad y Graham, J. Virol. (1986) 57:267-274; Bett y col., J. Virol. (1993) 67:5911-5921; Mittereder y col., Human Gene Therapy (1994) 5:717-729; Seth y col., J. Virol. (1994) 68:933-940; Barr y col., Gene Therapy (1994) 1:51-58; Berkner, K.L. BioTechniques (1988) 6:616-629; y Rich y col., Human Gene Therapy (1993) 4:461-676).

Adicionalmente, se han desarrollado diversos sistemas de vector de virus adenoasociado (AAV) para el suministro génico. Los vectores AAV pueden construirse fácilmente usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales Nº WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski y col., Molec. Cell. Biol. (1998) 8:3988-3996; Vincent y col., Vaccines 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. Current Opinion in Biotechnology (1992) 3:533-539; Muzyczka, N. Current Topics in Microbiol. and Immunol. (1992) 158:91-129; Kotin, R.M. Human Gene Therapy (1994) 5:793-801; Shelling y Smith, Gene Therapy (1994) 1:165-169; y Zhou y col., J. Exp. Med. (1994) 179:1867-1875).

Otro sistema de vector útil para suministrar polinucleótidos a las mucosas y de otro modo, es las vacunas de poxvirus recombinante administradas por vía entérica descritas por Small, Jr., y col. (patente de Estados Unidos Nº 5.676.950, expedida el 14 de octubre de 1997) así como el virus vaccinia y poxvirus aviares. A modo de ejemplo, pueden construirse recombinantes de virus vaccinia que expresan los genes del siguiente modo. Primero se inserta el ADN que codifica la secuencia codificante de gag/antígeno sintética particular en un vector apropiado de modo que esté adyacente a un promotor de vaccinia y secuencias de ADN de vaccinia flanqueantes, tales como, la secuencia que codifica la timidina quinasa (TK). Este vector después se usa para transfectar células que se infectan simultáneamente con vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de vaccinia más el gen que codifica las secuencias codificantes de interés en el genoma viral. El recombinante TK resultante puede seleccionarse cultivando las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y picando las placas de virus resistentes a la misma.

Como alternativa, también pueden usarse avipoxvirus, tales como los virus de la viruela de las aves de corral y del canario, para suministrar los genes. Se sabe que los avipoxvirus recombinantes que expresan inmunógenos de patógenos de mamíferos confieren inmunidad protectora cuando se administran a especies no aviares. El uso de un vector avipox es particularmente deseable en seres humanos y otras especies de mamíferos ya que los miembros del género avipox pueden replicarse de forma reproductiva solamente en especies de aves susceptibles y por lo

tanto no son infecciosos en células de mamífero. Los procedimientos para producir avipoxvirus recombinantes son conocidos en la técnica y emplean recombinación genética, como se ha descrito anteriormente con respecto a la producción de virus vaccinia. Véase, por ejemplo, el documento WO 91/12882; el documento WO 89/03429; y el documento WO 92/03545. También pueden usarse vectores derivados de picornavirus. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.614.413 y 6.063.384).

También pueden usarse vectores de conjugados moleculares, tales como los vectores quiméricos adenovirales descritos en Michael y col., J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103, para suministro génico.

Un sistema de infección/transfección basado en vaccinia puede usarse convenientemente para proporcionar una expresión inducible, transitoria de las secuencias codificantes de interés (por ejemplo, un casete de expresión de Gag/núcleo de VHC sintético) en una célula huésped. En este sistema, las células primero se infectan *in vitro* con un virus vaccinia recombinante que codifica la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa presenta especificidad depurada ya que solamente transcribe moldes que albergan promotores T7. Después de la infección, las células se transfectan con el polinucleótido de interés, dirigido por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus vaccinia recombinante transcribe el ADN transfectado en ARN que después se traduce en proteína por la maquinaria de traducción del huésped. El procedimiento proporciona una producción transitoria, citoplasmática de alto nivel de grandes cantidades de ARN y sus productos de traducción. Véase, por ejemplo, Elroy-Stein y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126.

3. Sistemas de amplificación

Como enfoque alternativo a la infección con virus vaccinia o avipoxvirus recombinantes, o para el suministro de genes usando otros vectores virales, puede usarse un sistema de amplificación que conducirá a un elevado nivel de expresión después de la introducción en células huésped. Específicamente, puede diseñarse un promotor de ARN polimerasa T7 precediendo la región codificante para la ARN polimerasa T7. La traducción del ARN obtenido de este molde generará la ARN polimerasa T7 que a su vez transcribirá más molde. De forma concomitante, habrá un ADNc cuya expresión está bajo el control del promotor T7. Por tanto, algo de la ARN polimerasa T7 generada a partir de la traducción del ARN molde de amplificación conducirá a la transcripción del gen deseado. Como se requiere algo de ARN polimerasa T7 para iniciar la amplificación, la ARN polimerasa T7 puede introducirse en las células junto con el molde o los moldes para cebar la reacción de transcripción. La polimerasa puede introducirse como una proteína o un plásmido que codifica la ARN polimerasa. Para un análisis adicional de sistemas T7 y su uso para transformar células, véase, por ejemplo, la publicación internacional Nº WO 94126911; Studier y Moffatt, J. Mol. Biol. (1986) 189:113-130; Deng y Wolff, Gene (1994) 143:245-249; Gao y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 200:1201-1206; Gao y Huang, Nuc. Acids Res. (1993) 21:2867-2872; Chen y col., Nuc. Acids Res. (1994) 22:2114-2120; y la patente de Estados Unidos Nº 5.135.855.

4. Vehículos de suministro liposomales/lipídicos

El polinucleótido de interés también puede suministrarse sin un vector viral. Por ejemplo, empaquetado como ADN o ARN en liposomas antes de su suministro al sujeto o a las células derivadas del mismo. La encapsulación en lípidos generalmente se consigue usando liposomas que son capaces de unirse de forma estable o atrapar y retener ácido nucleico. La proporción de ADN condensado a la preparación lipídica puede variar, pero generalmente será de aproximadamente 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido), o más de lípido. Para una revisión del uso de los liposomas como vehículos para el suministro de ácidos nucleicos, véase, Hug y Sleight, Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1097:1-17; Straubinger y col., en Methods of Enzymology (1983), Vol. 101, pág. 512-527.

Las preparaciones liposomales para su uso de acuerdo con la presente descripción incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras, siendo los liposomas catiónicos particularmente preferidos. Los liposomas catiónicos han demostrado mediar el suministro intracelular de ADN plasmídico (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416); ARNm (Malone y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs y col., J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192), en forma funcional.

Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas N[1-2-3-dioleiloxipropil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles con el nombre comercial Lipofectina, de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase, también, Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416). Otros liposomas disponibles en el mercado incluyen (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; publicación PCT Nº WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). Pueden prepararse micropartículas catiónicas a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento WO 01/136599 del mismo propietario que la presente.

Asimismo, están fácilmente disponibles liposomas aniónicos y neutros tales como de Avanti Lipids (Birmingham, AL), o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleilfosfatidil colina (DOPC), dioleilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en proporciones apropiadas. Los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los diversos complejos liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Straubinger y col., en METHODS OF IMMUNOLOGY (1983), Vol. 101, pág. 512-527; Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulos y col., Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilson y col., Cell (1979) 17:77; Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostro y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348; Enoch y Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145; Fraley y col., J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka y Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; y Schaefer-Ridder y col., Science (1982) 215:166.

El ADN y/o antígeno o antígenos proteicos también pueden suministrarse en composiciones lipídicas cocleadas similares a las descritas por Papahadjopoulos y col., Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394:483-491. Véanse, también, las patentes de Estados Unidos Nº 4.663.161 y 4.871.488.

5. Vehículos particulados

Las composiciones también pueden encapsularse, adsorberse a, o asociarse con, vehículos particulados. Dichos vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado al sistema inmune y promueven la migración, captura y retención de antígenos en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden captarse por células presentadoras de antígeno profesionales tales como macrófagos y células dendríticas, y/o pueden potenciar la presentación de antígeno a través de otros mecanismos tales como la estimulación de la liberación de citoquinas. Los ejemplos de vehículos particulados incluyen los derivados de polímeros de polimetilmetacrilato, así como micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidas como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffrey y col., Pharm. Res. (1993) 10:362-368; McGee JP, y col., J. Microencapsul. 14(2):197-210, 1997; O'Hagan DT, y col., Vaccine 11(2):149-154, 1993.

Además, pueden usarse otros sistemas particulados y polímeros para suministro *in vivo* o *ex vivo* del gen de interés. Por ejemplo, polímeros tales como polilisina; poliarginina, poliomitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas, son útiles para transferir un ácido nucleico de interés. Asimismo, la transfección mediada DEAE dextrano, la precipitación con fosfato cálcico o la precipitación usando otras sales inorgánicas insolubles, tales como, fosfato de estroncio, silicatos de aluminio incluyendo bentolita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco, y similares, encontrarán uso con los presentes procedimientos. Véase, por ejemplo, Felgner, P.L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5:163-187, para una revisión de los sistemas de suministro útiles para transferencia génica. También puede usarse peptoides (Zuckerman, R.N., y col., patente de Estados Unidos Nº 5.831.005, expedida el 3 de noviembre de 1998) para el suministro de una construcción descrita en este documento.

Adicionalmente, los sistemas de suministro biolísticos que emplean vehículos particulados tales como oro y tungsteno, son especialmente útiles para suministrar casetes de expresión sintéticos como se describe en este documento. Las partículas se revisten con el casete o casetes de expresión sintéticos a suministrar y se aceleran a alta velocidad, generalmente en una atmósfera reducida, usando una descarga accionada por pistola desde una "pistola génica". Para una descripción de dichas técnicas, y aparatos útiles para las mismas, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 4.945.050; 5.036.006; 5.100.792; 5.179.022; 5.371.015; y 5.478.744. Además, pueden usarse sistemas de inyección sin aguja (Davis, H.L., y col., Vaccine 12:1503-1509, 1994; Bioject, Inc., Portland, OR).

B. ANTÍGENOS

Cualquiera de los vehículos de suministro génico descritos en este documento puede contener una o más secuencias heterólogas que codifican uno o más productos génicos heterólogos, particularmente antígenos polipeptídicos. Puede usarse casi cualquier producto génico o polipéptido heterólogo. Los antígenos que son particularmente útiles en la práctica de la presente invención incluyen antígenos polipeptídicos derivados de patógenos de transmisión sexual u otros virus que infectan o se transmiten a través de las superficies mucosas. Los ejemplos representativos no limitantes de patógenos de transmisión sexual y antígenos derivados de los mismos incluyen antígenos derivados de patógenos bacterianos (por ejemplo, clamidia, gonorrea y sífilis) y patógenos víricos (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), virus de la hepatitis B y C ("VHB" y "VHC", respectivamente), el virus del papiloma humano ("VPH"), el virus del herpes simple ("VHS"), y similares). Los ejemplos no limitantes de otros virus que pueden transmitirse mediante las superficies mucosas incluyen rinovirus, influenza, virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la parainfluenza (VPI), y similares. Como se utiliza dentro del contexto de la presente invención, "parte inmunogénica" se refiere a una parte del antígeno respectivo que es capaz, en las condiciones apropiadas, de causar una respuesta inmune (es decir, mediada por células u humoral). Las

"partes" pueden ser de tamaño variable, pero son preferiblemente de al menos 9 aminoácidos de longitud, y pueden incluir el antígeno completo. Las respuestas inmunes mediadas por células pueden estar mediadas a través de presentación en el complejo principal de histocompatibilidad ("MHC") de clase I, presentación MHC de clase II, o ambas.

- 5 Los genes de VIH están localizados en la región central del ADN proviral y codifican al menos nueve proteínas divididas en tres clases principales: (1) las proteínas estructurales principales, Gag, Pol, y Env; (2) las proteínas reguladoras, Tat y Rev y (3) las proteínas accesorias, Vpu, Vpr, Vif, y Nef. Aunque se ejemplifica en este documento en relación a antígenos obtenidos de VIH_{SF2}, la secuencia obtenida de otras variantes de VIH pueden manipularse de un modo similar siguiendo los contenidos de la presente memoria descriptiva. Dichas otras variantes incluyen, aunque sin limitación, secuencias codificantes de la proteína Gag obtenidas de los aislados VIH_{IIIB}, VIH_{SF2}, VIH-1_{SF162}, VIH-1_{SF170}, VIH_{LAV}, VIH_{LAV1}, VIH_{MN}, VIH-1_{CM235}, VIH-1_{US4}, otras cepas de VIH-1 de diversos subtipos (por ejemplo, subtipos A a G, y O), cepas VIH-2 y diversos subtipos (por ejemplo, VIH-2_{UC1} y VIH-2_{UC2}) y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS). (Véase, por ejemplo, Virology, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B.N. Fields, y DM Knipe, eds. 1991); Virology, 3ª Edición (Fields, BN, DM Knipe, PM Howley, Editores, 1996, Lippincott-Raven, Filadelfia, PA; para una descripción de estos y otros virus relacionados).

Como se será evidente para un especialista en la técnica, pueden combinarse diversas partes inmunogénicas de los antígenos descritos anteriormente para inducir una respuesta inmune cuando se administran como se describe en este documento. Además, los vehículos de suministro génico que codifican el antígeno también pueden usarse en combinación con uno o más vehículos de suministro génico adicionales y/o polipéptidos.

- 20 Además, debido a la gran variabilidad inmunológica que se encuentra en diferentes regiones geográficas para la fase de lectura abierta de VIH, pueden preferirse combinaciones particulares de antígenos para su administración en regiones geográficas particulares. En resumen, se han identificado al menos ocho subtipos diferentes de VIH y, de estos, los virus de subtipo B son más prevalentes en Norteamérica, América Latina y el Caribe, Europa, Japón y Australia. Casi todos los subtipos están presentes en África Subsahariana, predominando los subtipos A y D en África Central y del Este, y el subtipo C en el Sur de África. El subtipo C también es prevalente en India y se ha identificado recientemente en el Sur de Brasil. El subtipo E se identificó inicialmente en Tailandia, y también está presente en la República de África Central. El subtipo F se describió inicialmente en Brasil y en Rumania. Los subtipos más recientes descritos son G, encontrado en Rusia y Gabón, y el subtipo H, encontrado en Zaire y en Camerún. Los virus del grupo O se han identificado en Camerún y también en Gabón. Por tanto, como será evidente para un especialista en la técnica, generalmente se prefiere construir un vector para la administración que sea apropiado para el subtipo de VIH particular que sea prevalente en la región geográfica de administración. Los subtipos de una región particular pueden determinarse por inmunodifusión doble bidimensional o secuenciando el genoma de VIH (o fragmentos del mismo) aislados de individuos en esa región.

- 35 Como se ha descrito anteriormente, el VIH también presenta diversos antígenos *Gag* y *Env*. Las proteínas *Gag* de VIH-1 están implicadas en muchas fases del ciclo vital del virus, incluyendo el ensamblaje, la maduración del virión después de la liberación de partículas, y las etapas tempranas después de la entrada en la replicación del virus. Las tareas de las proteínas *Gag* de VIH-1 son numerosas y complejas (Freed, E.O. (1998) Virology 251:1-15).

- Las secuencias codificantes de *Env* para su uso en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, secuencias polinucleotídicas que codifican los siguientes polipéptidos codificados por VIH: gp160, gp140, y gp120 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.792.459 para una descripción del polipéptido *Env* IDV-1_{SF2} ("SF2")). La proteína de envuelta de VIH-1 es una glucoproteína de aproximadamente 160 kD (gp160). Durante la infección vírica de la célula huésped, gp160 se escinde por las proteasas de la célula huésped para formar gp120 y la proteína de membrana integral gp41. La proteína gp41 se ancla en (y abarca) la bicapa de membrana del virión, mientras que el segmento gp120 sobresale en el entorno adyacente. Como no existe unión covalente entre gp120 y gp41, gp120 libre se libera de la superficie de los viriones y células infectadas. Por tanto, gp160 incluye las secuencias codificantes para gp120 y gp41. El polipéptido gp41 está compuesto por varios dominios incluyendo un dominio de oligomerización (OD) y un dominio transmembrana (TM). En la envuelta nativa, el dominio de oligomerización es necesario para la asociación no covalente de tres polipéptidos gp41 para formar una estructura trimérica: a través de interacciones no covalentes con el trímero gp41 (y el mismo), los polipéptidos gp120 también se organizan en una estructura trimérica. Existe un sitio de escisión (o sitios de escisión) aproximadamente entre las secuencias polipeptídicas para gp120 y las secuencias polipeptídicas correspondientes a gp41. Este sitio o sitios de escisión pueden mutarse para evitar la escisión en el sitio. El polipéptido gp140 resultante corresponde a una forma truncada de gp160 donde el dominio transmembrana de gp41 se ha eliminado. Este polipéptido gp140 puede existir en forma tanto monomérica como oligomérica (es decir, trimérica) en virtud de la presencia del dominio de oligomerización en el resto gp41. En la situación en la que se ha mutado el sitio de escisión para evitar la escisión y la parte transmembrana de gp41 se ha eliminado, el producto polipeptídico resultante puede denominarse gp140 "mutado". Como será evidente para los especialistas en el campo, el sitio de escisión puede mutarse en una diversidad de formas. (Véase, también, el documento WO 00/39302).

- 60 Como se ha indicado anteriormente, puede incorporarse al menos una parte inmunogénica de un antígeno de VIH en un vehículo de suministro génico y usarse para inmunización en las mucosas. La parte o partes inmunogénicas incorporadas en el vehículo (por ejemplo, construcción de vector alfaviral) puede ser de longitud variable, aunque

generalmente se prefiere que las partes sean de al menos 9 aminoácidos de longitud y pueden incluir el antígeno completo. La inmunogenicidad de una secuencia particular a menudo es difícil de predecir, aunque pueden predecirse epítopes de células T utilizando algoritmos informáticos tales como TSITES (MedImmune, Maryland), para explorar regiones codificantes para sitios T auxiliares y sitios CTL potenciales. A partir de este análisis, se sintetizan péptidos y se usan como dianas en un ensayo citotóxico *in vitro*. También pueden utilizarse, sin embargo, otros ensayos, por ejemplo, ELISA, que detecta la presencia de anticuerpos contra el vector recién introducido, así como ensayos que ensayan las células T auxiliares, tales como ensayos de interferón-gamma, ensayos de producción de IL-2 y ensayos de proliferación.

También pueden seleccionarse partes inmunogénicas por otros procedimientos. Por ejemplo, se ha demostrado que el ratón transgénico HLA A2.1 es útil como modelo para el reconocimiento de células T humanas de antígenos virales. En resumen, en los sistemas virales de influenza y hepatitis B, el repertorio de receptores de células T murinos reconoce los mismos determinantes antigénicos reconocidos por células T humanas. En ambos sistemas, la respuesta CTL generada en el ratón transgénico HLA A2.1 está dirigida a casi el mismo epítipo que los reconocidos por CTL humanas del haplotipo HLA A2.1. (Vitiello y col., (1991) J. Exp. Med. 173:1007-1015; Vitiello y col., (1992) Abstract of molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia).

Pueden obtenerse partes inmunogénicas adicionales del VIH truncando la secuencia codificante en diversas localizaciones incluyendo, por ejemplo, incluir uno o más epítipes de los diversos dominios del genoma de VIH. Como se ha indicado anteriormente, dichos dominios incluyen dominios estructurales tales como *Gag*, *Gag-polimerasa*, *Gag-proteasa*, *transcriptasa inversa (RT)*, *integrasa (IN)* y *Env*. Los dominios estructurales a menudo están adicionalmente subdivididos en polipéptidos, por ejemplo, p55, p24, p6 (*Gag*); p160, p10, p15, p31, p65 (*pol*, *prot*, *RT* e *IN*); y gp160, gp120 y gp41 (*Env*). Se conocen epítipes adicionales de VIH y otras enfermedades de transmisión sexual o pueden determinarse fácilmente usando procedimientos conocidos en la técnica. En la descripción también se incluyen variantes moleculares de dichos polipéptidos, por ejemplo, como se describe en los documentos PCT/US99/31245; PCT/US99/31273 y PCT/US99/31272.

También pueden abordarse otras enfermedades de transmisión sexual o por las mucosas, tanto víricas como bacterianas, usando las composiciones y procedimientos descritos en este documento. Por ejemplo, parece que en el caso de VHS, la inmunización vaginal con un vector que expresa antígenos VHS (por ejemplo, gB, gD) puede proporcionar protección contra vaginal. Por tanto, pueden usarse uno o más antígenos derivados de VHS como se describe en este documento para tratar y prevenir la infección por VHS.

1. Preparación de vectores que portan productos génicos heterólogos

En ciertas realizaciones, se incorporan secuencias que codifican uno o más antígenos en un vehículo de suministro génico tal como un vector o partícula viral. Como será evidente para los especialistas en la técnica dada la descripción proporcionada en este documento, la eficacia del empaquetado y por tanto, el título vírico de diversos vectores virales es en algún grado dependiente del tamaño de la secuencia a empaquetar. Por tanto, para aumentar la eficacia del empaquetado y la producción de partículas de vector viable (por ejemplo, partículas de vector alfaviral), pueden añadirse secuencias no codificantes adicionales a la construcción del vector.

En ciertas aplicaciones de los vectores o partículas resultantes descritas en este documento, se desea la expresión de más de un gen heterólogo. Por ejemplo, para tratar una enfermedad de transmisión sexual tal como el VIH, pueden requerirse múltiples administraciones de vectores o partículas, o la administración de vectores o partículas de expresión de más de un producto génico. Además, la inmunogenicidad puede potenciarse adicionalmente codificando tanto el antígeno como un inmunomodulador (por ejemplo, citoquina, linfoquina, quimioquina, etc.). Por lo tanto, en una realización de la invención pueden construirse vectores virales (por ejemplo, vectores alfavirales) colocando señales apropiadas, tales como sitios poslectura de ribosomas o sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) entre cistronas. Como alternativa, pueden utilizarse múltiples promotores de la región de unión subgenómica (por ejemplo, derivados de alfavirus). Además, una construcción de vector puede expresar (por separado o como una construcción) todo o partes inmunogénicas de diversos patógenos transmitidos por las mucosas (por ejemplo, transmisión sexual).

En un aspecto de la invención, se proporcionan construcciones de vector (por ejemplo, vectores y partículas alfavirales) que dirigen la expresión de partes inmunogénicas de antígenos de VIH. La forma integrada de VIH-1, también conocida como el provirus, es de aproximadamente 9,8 kilobases de longitud (véase, por ejemplo, Muesing y col., (1985) Nature 313:450-48). Ambos extremos del provirus están flanqueados por una secuencia repetida conocida como repeticiones terminales largas (LTR).

Las secuencias que codifican las proteínas descritas anteriormente (por ejemplo, antígenos) pueden obtenerse fácilmente a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo por ejemplo, bancos de depósito tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), o de fuentes comerciales tales como British Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, Inglaterra). Los ejemplos representativos de genomas clonados de forma molecular que codifican el virus de la hepatitis B pueden obtenerse de fuentes tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Por ejemplo, ATCC N° 45020 contiene el ADN genómico total de la hepatitis B (extraído de partículas

Dane purificadas) (véase la figura 3 de Blum y col., TIG 5(5):154-158, 1989) en el sitio *Bam* HI de pBR322 (Moriarty y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2606-2610, 1981).

Como alternativa, pueden generarse secuencias que codifican el polipéptido de interés por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Mullis y col., (1987) Methods Enzymol. 155:335-350; PCR Protocols, A. Guide to Methods and Applications, Innis y col., (eds) Harcourt Brace Jovanovich Publishers, NY (1994)). Esta técnica usa la ADN polimerasa, habitualmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región deseada de ADN. La región de ADN a replicar se identifica por oligonucleótidos de secuencia específica complementaria a extremos opuestos y cadenas opuestas del ADN deseado para cebar la reacción de replicación. Ciclos sucesivos repetidos de replicación provocan la amplificación del fragmento de ADN delimitado por el par cebador usado. Varios parámetros influyen en el éxito de la reacción. Entre ellos están la temperatura y tiempo de hibridación, el tiempo de extensión, la concentración de Mg^{2+} y ATP, el pH, y la concentración relativa de los cebadores, moldes, y desoxirribonucleótidos.

Una vez se han preparado o aislado las secuencias codificantes para las proteínas deseadas, dichas secuencias pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado. Los especialistas en la técnica conocen numerosos vectores de replicación, y la selección de un vector de clonación apropiado es cuestión de elección. Los ligamientos a otras secuencias se realizan usando procedimientos convencionales, conocidos en la técnica.

2. Preparación polipeptídica

Asimismo, las secuencias codificantes seleccionadas pueden clonarse en cualquier vector de expresión adecuado para su expresión. El producto expresado puede purificarse opcionalmente antes de la administración a las mucosas. En resumen, puede introducirse un polinucleótido que codifica estas proteínas en un vector de expresión que puede expresarse en un sistema de expresión adecuado. Está disponible en la técnica una diversidad de sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, de mamífero, de insecto, y vegetales y puede usarse cualquiera de dichos sistemas de expresión. Opcionalmente, puede traducirse un polinucleótido que codifica estas proteínas en un sistema de traducción sin células. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Las proteínas también pueden construirse por síntesis proteica en fase sólida. Si se desea, los polipéptidos también pueden contener otras secuencias de aminoácidos, tales como enlazadores de aminoácidos o secuencias señal, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa y la proteína A de estafilococos. Como alternativa, pueden adquirirse antígenos de interés de fuentes comerciales.

C. SUMINISTRO

Las composiciones (por ejemplo, vehículos de suministro génico y antígenos polipeptídicos opcionales) descritas en este documento pueden suministrarse usando cualquier medio adecuado (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, oral, rectal, intraocular, intranasal), o por diversos procedimientos físicos tales como lipofección (Felgner y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417), inyección directa de ADN (Acsadi y col. (1991) Nature 352:815-818); bombardeo con microproyectiles (Williams y col. (1991) PNAS 88:2726-2730); liposomas de varios tipos (véase, por ejemplo, Wang y col. (1987) PNAS 84:7851-7855); $CaPO_4$ (Dubensky y col. (1984) PNAS 81:7529-7533); ligando de ADN (Wu y col. (1989) J. of Biol. Chem. 264:16985-16987); administración de polipéptidos solos; administración de ácidos nucleicos solos (documento WO 90/11092); o administración de ADN unido a adenovirus muertos (Curiel y col. (1992), Hum. Gene Ther. 3:147-154); mediante compuestos policationicos tales como polilisina, utilizando ligandos específicos de receptor; así como con virus inactivados con psoraleno tales como Sendai o Adenovirus. Además, los sistemas de inicio de vectores estratificados eucarióticos pueden administrarse directamente (es decir, *in vivo*), o a células que se han retirado (*ex vivo*), y posteriormente se devuelven.

En una realización preferida, los vehículos de suministro génico y las composiciones que contienen polipéptidos opcionales se administran a las mucosas. Los procedimientos de suministro a las mucosas son conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en *Remington's, supra*. El suministro de las composiciones por vía rectal y vaginal es particularmente preferido en el caso de patógenos de transmisión sexual, ya que este modo de administración proporciona acceso a las células expuestas primero a los patógenos. Asimismo, puede preferirse la administración intranasal en enfermedades, como los rinovirus, que infectan a través de la mucosa nasal. En algunos casos, la administración intranasal puede inducir inmunidad en la mucosa vaginal y la inmunización oral puede inducir inmunidad en la mucosa rectal. Además, pueden usarse combinaciones de diversas vías de administración a las mucosas y/o diversas vías de administración sistémica para inducir una inmunidad y protección óptimas (tanto en el sitio en el que entra el patógeno como en sitios sistémicos donde se ha propagado un patógeno de las mucosas). Además, la administración a las mucosas elimina la necesidad de jeringas u otros dispositivos de administración. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis.

En ciertas realizaciones, los vectores deficientes en la replicación se administran mediante inmunización con ácido nucleico o similares usando protocolos de suministro génico convencionales. Los procedimientos para el suministro de genes son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. Las composiciones alfavirales pueden suministrarse directamente al sujeto vertebrado o, como alternativa, pueden suministrarse *ex vivo* a células obtenidas del sujeto y las células se reimplantan en el

sujeto. En realizaciones preferidas, las composiciones se suministran *in vivo*. El suministro de composiciones deficientes en la replicación *in vivo* generalmente puede conseguirse usando cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por inyección usando una jeringa convencional, dispositivos sin aguja tales como Bioject® o una pistola génica, tal como el sistema de suministro génico Accell® (PowderJect Technologies, Inc., Oxford, Inglaterra). Las construcciones pueden suministrarse (por ejemplo, inyectarse) por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intramuscular, intravenosa, a las mucosas (tal como por vía nasal, rectal y vaginal), por vía intraperitoneal, oral o combinaciones de las mismas.

En otros aspectos, se describen procedimientos para administrar los sistemas de suministro génico descritos en este documento, incluyendo vectores o partículas alfavirales recombinantes. En resumen, el modo final de administración del vector viral habitualmente depende de la aplicación terapéutica específica, el mejor modo para aumentar la potencia del vector, y la vía más adecuada de administración. En líneas generales, esta realización incluye composiciones que pueden estar diseñadas para suministrarse por, por ejemplo, (1) inyección directa en el torrente sanguíneo; (2) inyección directa en un tejido o tumor específico; (3) administración oral; (4) inhalación nasal; (5) aplicación directa a tejidos mucosos (por ejemplo, por vía intranasal, intrarrectal y/o intravaginal); y/o (6) administración *ex vivo* de células autólogas transducidas en el animal. Por tanto, el vector alfaviral terapéutico puede administrarse de tal modo que el vector pueda (a) transducir una célula sana normal y transformar la célula en una productora de una proteína o agente terapéutico que se secreta de forma sistémica o local, (b) transformar una célula anormal o defectuosa, transformando la célula en un fenotipo de funcionamiento normal, (c) transformar una célula anormal de modo que se destruya, y/o (d) transducir células para manipular la respuesta inmune.

Las composiciones descritas en este documento pueden administrarse solas o pueden administrarse con uno o más vehículos de suministro génico adicionales y/o una o más proteínas. En dichas realizaciones, las múltiples composiciones pueden administrarse en cualquier orden, por ejemplo, el vehículo de suministro génico seguido de proteína; múltiples vehículos de suministro génico seguidos de múltiples administraciones de proteínas; una o más administraciones de proteínas seguidas de una única o múltiples administraciones de vehículos de suministro génico; administración concurrente; y similares. Por tanto, puede administrarse una mezcla de proteína y ácido nucleico, usando el mismo o diferentes vehículos y el mismo o diferentes modos de administración.

En ciertas realizaciones, el suministro directo generalmente se conseguirá con o sin vectores virales, como se ha descrito anteriormente, por inyección usando una jeringa convencional o una pistola génica, tal como el sistema de suministro génico Accell® (PowderJect Technologies, Inc., Oxford, Inglaterra).

Por tanto, la inyección puede ser por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intramucosa tal como nasal, rectal, oral y vaginal, por vía intraperitoneal, intravenosa, o intramuscular. Otros modos de administración incluyen administración pulmonar, supositorios, inyección sin aguja, aplicaciones transcutáneas y transdérmicas. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Como se ha indicado anteriormente, la administración de ácidos nucleicos también puede combinarse con la administración de péptidos u otras sustancias.

D. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente descripción también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un vector deficiente en la replicación (por ejemplo, construcción alfaviral recombinante o partícula alfaviral) en combinación con un vehículo, diluyente, o receptor farmacéuticamente aceptable. Además, también pueden estar presentes otros ingredientes, tales como adyuvantes. Como se describe más completamente en la patente de Estados Unidos Nº 6.015.694, se necesitan particularmente composiciones inmunogénicas de fácil administración y estables en almacenamiento en países del Tercer Mundo donde no están fácilmente disponibles la refrigeración y/o medios de administración tradicionales (jeringas, etc.).

En ciertas realizaciones, también pueden incluirse polipéptidos. La preparación de compuestos inmunogénicos que contienen uno o más polipéptidos inmunogénicos como ingredientes activos es conocida para los especialistas en la técnica. Típicamente, dichos compuestos inmunogénicos se preparan como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o la proteína puede encapsularse en liposomas.

Las composiciones descritas en este documento preferiblemente comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el huésped. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Los vehículos adecuados típicamente son macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas), y partículas víricas inactivas. Los ejemplos de vehículos particulados incluyen los derivados de polímeros de polimetil metacrilato, así como micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidas como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10362-368; McGee y col. (1997) J Microencapsul. 14(2): 197-210; O'Hagan y col. (1993) Vaccine 11(2):149-54. Dichos vehículos son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Además, estos

vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). Además, el antígeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como toxoide diftérico, tetánico, colérico, etc., así como toxinas derivadas de *E. coli*.

También pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables en las composiciones descritas en este documento, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, o benzoatos. Sustratos proteicos especialmente útiles son albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas para los especialistas en la técnica. Las composiciones descritas en este documento también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, glicerol, dextrosa, etanol, o similares, individualmente o en combinación, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. También pueden usarse los liposomas como un vehículo para una composición descrita en este documento. Dichos liposomas se han descrito anteriormente.

En resumen, con respecto a partículas virales, los vectores deficientes en la replicación (también mencionados anteriormente como partículas) pueden conservarse en forma bruta o purificada. Los procedimientos y condiciones de conservación se describen en la patente de Estados Unidos N° 6.015.694.

Además, las composiciones descritas en este documento pueden incluir diversos excipientes, adyuvantes, vehículos, sustancias auxiliares, agentes de modulación, y similares. Preferiblemente, las composiciones incluirán una cantidad del antígeno suficiente para montar una respuesta inmunológica. Una cantidad eficaz apropiada puede determinarla un especialista en la técnica. Dicha cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios y generalmente será una cantidad del orden de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1000 µg, más preferiblemente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 300 µg, de partícula/antígeno.

Dichos adyuvantes incluyen, aunque sin limitación: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite-en-agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59 (publicación internacional N° WO 90/14837), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5% (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueado con pluronic al 5%, y thr-MDP (véase a continuación) microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y el esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (3) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o pueden generarse partículas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citoquinas, tales como interleuquinas (IL-1, IL-2, etc.), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de necrosis tumoral (TNF), quimioquinas beta (MIP, 1-alfa, 1-beta Rantes, etc.); (6) mutantes destoxificados de una toxina ADP-ribosilante bacteriana tal como la toxina colérica (CT), una toxina pertussis (PT), o una toxina inestable al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (donde el aminoácido de tipo silvestre en la posición 63 está sustituido por lisina), LT-R72 (donde el aminoácido de tipo silvestre en la posición 72 está sustituido por arginina), CT-S109 (donde el aminoácido de tipo silvestre en la posición 109 está sustituido por serina), y PT-K9/G129 (donde el aminoácido de tipo silvestre en la posición 9 está sustituido por lisina y glicina en la posición 129) (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO93/13202; WO92/19265; WO 95/17211; WO 98/18928 y WO 01/22993); y (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición.

Los muramil péptidos incluyen, aunque sin limitación, N-acetil-muramil-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-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

La administración de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento puede ser por cualquier vía adecuada (véase, por ejemplo, la sección C). Es particularmente preferida la administración a las mucosas (por ejemplo, rectal y/o vaginal). El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que un ciclo principal de vacunación puede ser con 1-10 dosis diferentes, seguidas de otras dosis dadas a intervalos de tiempo posteriores, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo a 1-4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una o más dosis posteriores después de varios meses. El régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, por la potencia de la modalidad, el suministro de vacuna empleado, la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del médico.

En otras realizaciones más, se emplearán ventajosamente múltiples administraciones (por ejemplo, administración tipo

sensibilización-refuerzo). Por ejemplo, se administran partículas alfavirales I recombinantes que expresan el o los antígenos de interés (por ejemplo, IVAG o IR). Posteriormente, se administran el o los antígenos, por ejemplo, en composiciones que comprenden el o los antígenos polipeptídicos y un adyuvante adecuado. Como alternativa, los antígenos se administran antes de los vehículos de suministro génico. También pueden emplearse múltiples polipéptidos y múltiples administraciones de vehículo de suministro génico (en cualquier orden).

E. PROCEDIMIENTOS PARA UTILIZAR PARTÍCULAS DEFICIENTES EN LA REPLICACIÓN Y POLIPÉPTIDOS ANTIGÉNICOS

En ciertos aspectos de la presente descripción, se proporcionan composiciones y procedimientos para administrar a las mucosas una composición (por ejemplo, una construcción de vector alfaviral) que es capaz de prevenir, inhibir, estabilizar o revertir enfermedades de transmisión sexual. Los ejemplos representativos de dichas enfermedades incluyen infecciones bacterianas y víricas, particularmente infecciones de transmisión sexual, incluyendo, aunque sin limitación, VIH, VHB, VLTH I, VLTH II, VPH, VHS, VHC, clamidia, gonorrea, y/o sífilis.

Más específicamente, en un aspecto de la presente descripción, se proporcionan composiciones y procedimientos para estimular una respuesta inmune (humoral o mediada por células) contra un agente patológico de transmisión sexual, de modo que el agente patológico se elimine o inhiba. Los ejemplos representativos de agentes patológicos incluyen bacterias y virus.

En una realización de la descripción, el agente patológico es un virus, y se proporcionan procedimientos para estimular una respuesta inmune específica e inhibir la propagación vírica usando partículas víricas alfavirales recombinantes diseñadas para suministrar una construcción de vector que dirija la expresión de un antígeno o forma modificada del mismo a células diana susceptibles capaces de (1) iniciar una respuesta inmune contra el antígeno viral o (2) prevenir la propagación vírica ocupando los receptores celulares necesarios para las interacciones del virus. La expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico del vector puede ser transitoria o estable en el tiempo. Cuando tiene que estimularse una respuesta inmune contra un antígeno patológico, el alfavirus recombinante se diseña preferiblemente para que exprese una forma modificada del antígeno que estimulará una respuesta inmune y que tiene patogenicidad reducida con relación al antígeno nativo. Esta respuesta inmune se consigue cuando las células presentan los antígenos de la manera correcta, es decir, en el contexto de las moléculas MHC de clase I y/o II junto con moléculas accesorias tales como CD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, o análogos de las mismas (por ejemplo, Altmann y col., Nature 338:512, 1989). Se espera que las células infectadas con vectores alfavirales hagan esto de forma eficaz porque imitan muy bien la infección vírica auténtica y porque: (a) son capaces de infectar células no replicantes, (b) no se integran en el genoma de la célula huésped, (c) no están asociados con ninguna enfermedad amenazante de la vida, y (d) expresan altos niveles de proteína heteróloga. A causa de estas diferencias, los vectores alfavirales pueden considerarse fácilmente vectores virales seguros que pueden usarse en individuos sanos para su uso en vacunas.

Este aspecto de la descripción tiene una ventaja adicional sobre otros sistemas que puede esperarse que funcionen de una manera similar, ya que las células presentadoras son completamente viables y sanas y se expresan bajos niveles de antígenos virales, con relación a los genes heterólogos. Esto presenta una ventaja distinta ya que los epítopes antigénicos expresados pueden alterarse por clonación selectiva de sub-fragmentos del gen para el antígeno en el alfavirus recombinante, lo que conduce a respuestas contra epítopes inmunogénicos que de lo contrario pueden ocultarse por epítopes inmunodominantes. Dicho enfoque puede extenderse a la expresión de un péptido que tiene múltiples epítopes, derivando uno o más de los epítopes de diferentes proteínas. Además, este aspecto de la invención permite una estimulación eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) dirigidos contra epítopes antigénicos, y fragmentos peptídicos de antígenos codificados por sub-fragmentos de genes, a través de síntesis intracelular y asociación de estos fragmentos peptídicos con moléculas MHC clase I. Este enfoque puede utilizarse para mapear epítopes inmunodominantes principales para la inducción de CTL.

Las composiciones (por ejemplo, construcciones y partículas alfavirales) adecuadas para la administración a las mucosas descritas en este documento pueden incluir uno o más atenuantes inhibidores, por ejemplo, un gen inhibidor viral o bacteriano que expresa un péptido anti-sentido o similar. Se describe un análisis de atenuantes inhibidores, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 6.015.686 que describe cómo los antígenos y atenuantes inhibidores (por ejemplo, que expresan tat anti-sentido, etc.) pueden co-expresarse y/o diseñarse para sobre-expresar proteínas necesarias para la infección, tales como CD4. De este modo, una cantidad relativamente pequeña de células resistentes a VIH infectadas con vector actúan como "sumidero" o "imán" para múltiples acontecimiento de fusión no productivos con virus libre o células infectadas con virus. En el caso del VIH, los dos agentes de interacción son la proteína de envuelta gp 120/gp 41 y la molécula receptora CD4. Por tanto, un bloqueante apropiado sería una construcción de vector que exprese un análogo de env de VIH que bloquee la entrada del VIH sin causar efectos patológicos, o un análogo del receptor CD4. El análogo de CD4 se secretaría y funcionaría protegiendo a las células adyacentes, mientras que gp 120/gp 41 se secreta o produce solamente de forma intracelular para proteger solamente la célula que contiene el vector. Puede ser ventajoso añadir cadenas pesadas de inmunoglobulina humana u otros componentes a CD4 para potenciar la estabilidad o la lisis del complemento. El suministro de un vector alfaviral que codifica dicho híbrido de CD4 soluble a un huésped provoca un suministro continuo de una molécula híbrida estable. La eficacia del tratamiento puede ensayarse midiendo los indicadores habituales de progreso de la enfermedad, incluyendo el nivel de anticuerpos, la producción de antígeno

viral, los niveles de VIH infeccioso, o los niveles de infecciones no específicas.

Dicha proteína represora de la transcripción puede seleccionarse para cultivo tisular usando cualquier promotor de la transcripción específico para el virus cuya expresión se estimule por una proteína transactivadora específica del virus (como se ha descrito anteriormente). En el caso específico del VIH, una línea celular que exprese la proteína tat de VIH y el gen VHSTK dirigido por el promotor de VIH morirá en presencia de ACV. Sin embargo, si se introduce una serie de genes tat mutados en el sistema, crecerá y se seleccionará un mutante con las propiedades apropiadas (es decir, reprime la transcripción a partir del promotor de VIH en presencia de tat de tipo silvestre). El gen mutante después puede volver a aislarse de estas células. Puede usarse una línea celular que contenga múltiples copias del sistema de vector/tat letal condicionado para asegurar que los clones celulares supervivientes no están causados por mutaciones endógenas en estos genes. Después se introduce una serie de genes tat mutagenizados de forma aleatoria en estas células usando un vector alfaviral "recuperable" (es decir, uno que expresa la proteína tat mutante y contiene un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a fármacos para el crecimiento y selección en bacterias). Esto permite evaluar una gran cantidad de mutaciones aleatorias y permite una fácil clonación molecular posterior de la línea celular mutante deseada. Este procedimiento puede usarse para identificar y utilizar mutaciones en una diversidad de sistemas de activador de la transcripción viral/promotor viral para terapias antivirales potenciales.

Los atenuantes inhibidores adicionales que pueden usarse en los vehículos de terapia génica descritos en este documento incluyen sistemas en los que la expresión del transgén heterólogo puede reducirse (suprimirse) en células deseadas, incluyendo durante el proceso de empaquetado del virión, por ejemplo, incluyendo un ligando de unión a TOP y elementos de empaquetado en el vector. Como se describe, por ejemplo, en el documento de Estados Unidos con número de serie 09/608.730 del mismo propietario que la presente, estos procedimientos permite la supresión de la traducción de transgenes en células productoras de viriones manteniendo al mismo tiempo la capacidad de alto nivel de expresión y traducción del transgén en todos los demás tipos celulares. Estos sistemas también son aplicables a una diversidad de vectores virales y, además, pueden combinarse con otros sistemas de producción de viriones incluyendo, por ejemplo, la construcción de virión adenoviral en un sistema cre-lox.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación. Los aspectos de los siguientes ejemplos que no están relacionados específicamente con la invención reivindicada se incluyen por comparación e ilustración solamente.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Ratones y líneas celulares

Se adquirieron ratones Balb/c hembra de Charles River Breeding Laboratories y tenían una edad de 6 a 8 semanas el inicio de los estudios. Se usó la línea celular de fibroblastos SvBalb (H-2^d) como células diana. Esta línea celular expresa moléculas MHC de clase I pero no de clase II y por lo tanto está dirigida contra células CD8⁺ pero no CD4⁺.

Materiales

p7 g es un epítipo VIH-1_{SP2}p24 gag CTL restringido a H-2K^d y es un péptido sintético de 9 unidades: (aa, 199-AMQMLKETI-207).(21) Este péptido se sintetizó con extremos N amina libres y extremos C ácidos libres usando procedimientos en fase sólida con Fmoc por Research Genetics (Huntsville AL) (véase, por ejemplo, Mathiowitz y col. Nature 386: 410-414).

Inmunizaciones

Se usaron grupos de 5 ratones Balb/C hembra para cada vacuna o vía de inmunización y los tejidos se combinaron después del sacrificio. Los datos se presentan como representativos de 2-4 de dichos puntos de datos con resultados similares o idénticos. Todas las inmunizaciones se realizaron 3-4 veces a intervalos de 2-3 semanas. Se realizaron inmunizaciones IN con 2,5E10⁶ partículas SIN en un volumen de 25 µl suspendidas en PBS. Las inmunizaciones IN se realizaron sin anestesia. Las inmunizaciones IVAG e IR con 2,5E10⁶ en un volumen de 12,5 µl se realizaron en ratones anestesiados que se mantuvieron en posición recostada dorsal durante 20 minutos. Las inmunizaciones IM se realizaron en el músculo del muslo con 2,5E10⁶ partículas SIN en un volumen de 50 µl. Los ratones se sacrificaron una semana después de la inmunización final.

Sueros y recogida de tejido

Se extrajo sangre de los ratones a través del plexo retro-orbital un día antes del sacrificio y se separaron los sueros para ensayos ELISA. Se recogieron los ganglios linfáticos cervicales (CLN), los ganglios linfáticos ilíacos (ILN), los tejidos mucosos de la vaginal/útero (VUM) y los bazos (SP) y se combinaron a partir de 5 ratones por grupo y se usaron suspensiones celulares sencillas para un ensayo CTL de liberación de ⁵¹Cr convencional (excepto VUM), un ELISPOT específico para el epítipo gag para detectar células secretoras de IFN-γ (IFNSC) o ELISPOT específico

para gag-p55 para detectar células secretoras de anticuerpos (ASC).

Preparación de suspensiones celulares sencillas

Se inmunizaron grupos de 5 ratones 3 veces como se ha descrito anteriormente a través de las vías IN, IM, IR o IVAG con intervalos de 2-3 semanas. Una semana después de la inmunización final se recogieron los SP, CLN e ILN de los grupos de 5 ratones inmunizados cada uno y se combinaron. Los tejidos SP, CLN e ILN se separaron a través de una malla de nylon con un diámetro de poro de 250 µm y se lavaron tres veces en los medios (medios ELISPOT: RPMI que contenía FCS al 10%, antibióticos, Hepes y L-glutamina (RPMI completo); medio de ensayo de liberación de ⁵¹Cr), se contaron y se sembraron en pocillos para ensayo ELISPOT o de liberación de ⁵¹Cr. Las suspensiones celulares sencillas de VUM se prepararon en base al procedimiento descrito por Holmgren (véase, por ejemplo, Lycke y Holmgren (1986) *Immunology* 59:301-308) con modificaciones retirando la vagina completa, el útero y las trompas uterinas de combinaciones de 5 ratones por grupo. Las trompas uterinas se cortaron longitudinalmente y junto con los tejidos vaginal y uterino se trocearon en trozos de 5 mm. Los trozos de tejido después se lavaron tres veces en HBSS con Ca++ y Mg++ que contenía FCS al 10% y Hepes 5 mM (HBSS completo). Los trozos después se trataron enzimáticamente en agitación a 37°C secuencialmente una vez con 1 mg/ml de colagenasa/dispasa más 0,5 mg/ml de DNasa en HBSS completo durante 30 min. y dos veces con colagenasa más 0,5 mg/ml de DNasa en RPMI completo durante 45 min. Después de cada tratamiento enzimático se recuperaron las células liberadas y se lavaron dos veces con RPMI completo. Las suspensiones celulares recuperadas de cada tratamiento enzimático se combinaron y contaron. Este procedimiento producía de forma rutinaria la recuperación de un mínimo de 10⁷ células mononucleares (MNC) viable por cinco ratones.

Ensayo CTL de liberación de ⁵¹Cr

Se prepararon suspensiones celulares sencillas a partir de los tejidos como se ha descrito anteriormente y se cultivaron en una placa de 24 pocillos a 5x10⁶ células por pocillo. De estas células, se sensibilizaron 1x10⁶ con péptido p7g sintético (aminoácidos 194-213) a una concentración de 10 mM durante 1 hora a 37°C y después se lavaron y se co-cultivaron con las 4x10⁶ células no tratadas restantes. Las células se estimularon en forma de un cultivo masivo en 2 ml de medio de cultivo de esplenocitos: RPMI 1640 con L-glutamina 100 mM (Gibco, Grand Island, Nueva York, EEUU)/-Mem (medio esencial mínimo medio alfa con L-glutamina, desoxirribonucleósidos o ribonucleósidos) (1:1) suplementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10% (Hyclone, Logan, Utah, EEUU), 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomina, 10 ml/l de piruvato sódico 100 mM y 2-mercaptoetanol 50 M. Además, se usó IL2 Rat T-Stim al 5% (Rat T-Stim; Collaborative Biomedical Products, Bedford, Massachusetts, EEUU) como fuente de IL2 y se añadió a los medios de cultivo justo antes de que las células se cultivaran.

Después de un periodo de estimulación de 6 a 7 días, las células se recogieron y se usaron como efectores en un ensayo e liberación de ⁵¹Cromo. Se incubaron aproximadamente 10⁶ células diana SV/Balb en 200 µl de medio que contenía 50 Ci de ⁵¹Cr y con el péptido correcto p7g, o un par de célula-diana desapareado como control negativo a una concentración de 1 M durante 60 min. y se lavaron. Las células efectoras se cultivaron con 5x10³ células diana a diversas proporciones de efector a diana en 200 µl de medio de cultivo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (de fondo redondo o en v) durante 4 h. Se usaron las cpm promedio de pocillos duplicados para calcular el porcentaje de liberación específica como se presenta en este documento.

Ensayos ELISPOT

Se añadieron suspensiones celulares sencillas de CLN y SP combinados de 5 ratones por grupo sobre placas de nitrocelulosa o pvdf (Milipore) pre-revestidas con un anticuerpo de rata monoclonal anti-IFN-γ de ratón (Pharmingen) y p55 y se bloquearon con medio RPMI completo a pH 7,2, que contenía suero de ternera fetal al 10%, Hepes 5 mM, y antibióticos. Para la detección del total de células secretoras de anticuerpo (ASC) específico para p55, después de incubación durante una noche de las células a 37°C, las placas se lavaron con PBS/Tween al 0,05% (P/T). Se añadió anticuerpo de cabra anti-IgH+L biotinilado (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama) a dilución 1:7000 en PBS/suero de cabra normal al 1% y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas. Las placas se lavaron con P/T y se incubaron durante 1 h. a 37°C con avidina-peroxidasa a dilución 1:1000 (Pharmingen). Las placas se lavaron con P/T y las manchas se visualizaron añadiendo DAB en tampón Tris-HCl durante 30 minutos. Las placas se lavaron con agua desionizada y se secaron al aire. Las manchas se contaron manualmente a bajo aumento a partir de pocillos duplicados por grupo y por tejido. Los resultados se presentan como ASC por 10 millones de células y son representativos de al menos dos experimentos con resultados similares.

Para la detección de células secretoras de IFN-γ después de incubación durante una noche de las células en presencia de péptido p7g derivado de gag, o anticuerpo anti-CD3 (Pharmingen) y anti-CD28 (Pharmingen) como control positivo para la activación de células T policlonales, o solamente medio como control negativo, se lavaron las placas y se añadió anticuerpo anti-IFN-γ biotinilado (Pharmingen) en PBS/BSA al 0,1%/Tween al 0,02% y se incubaron a TA durante 2 horas. Las placas se lavaron con P/T y se incubaron durante 1 h. a 37°C con avidina-peroxidasa (Pharmingen) a dilución 1:1000. Las placas se lavaron con P/T y las manchas se visualizaron añadiendo DAB en tampón Tris-HCl durante 30 minutos. Las placas se lavaron con H2O desionizada y se secaron al aire. Las manchas se contaron con un lector ELISPOT automático desarrollado en la propia organización usando el software

de Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA).

Ensayos ELISA

Los títulos séricos de IgG específica para p55 gag de VIH-1 se cuantificaron por un ensayo ELISA convencional. En resumen, se revistieron placas ELISA (de 96 pocillos con fondo en U de Nunc Maxisorp) con proteína p55 a 5 µg/pocillo. Después de lavar con 1X PBS + Tween 20 al 0,03% (Sigma), los pocillos se bloquearon y se añadieron las muestras en diluciones seriadas en un diluyente de ensayo compuesto por 1X PBS + suero de cabra al 5% (Gibco Brl) + Tween 20 al 0,03% (Sigma). Se incluyó un suero convencional en cada ensayo para propósitos de cuantificación. Las muestras y los sueros convencionales se incubaron a 37°C durante una hora y se lavaron con PBS/Tween al 0,03%. Las muestras después se incubaron con una dilución 1:40000 de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-HRP (Caltag) y se revelaron con tetrametilbenzidina (TMB-Kirkegaard y Perry) durante 15 minutos y después se detuvieron con HCl 2 N. La densidad óptica de cada pocillo se midió usando Titertek a 450 nm.

Ejemplo 2

Respuestas CTL después de inmunizaciones en las mucosas frente a sistémicas con SIN-gag antes de estimulación con virus vaccinia (VV)-gag

Se evaluó la capacidad de las partículas SIN-gag de inducir respuestas CTL locales y sistémicas específicas para gag a través de diversas vías de inmunización en las mucosas o sistémica. Los ratones se inmunizaron por vía intranasal (IN) o intramuscular (IM) con $2,5 \times 10^6$ partículas SIN-gag y por vía intravaginal (IVAG) o intrarrectal (IR) con 10^7 partículas SIN-gag y se sacrificaron 7 días después de la inmunización final. Para determinar las respuestas CTL sistémicas específicas para gag, se prepararon suspensiones celulares sencillas a partir de CLN, ILN, VUM y SP y se realizó un ensayo ELISPOT de IFN- γ específico para gag. Se observaron respuestas CTL locales específicas para gag en CLN después de las inmunizaciones IN. En contraste, no se observaron respuestas CTL locales en ILN o en VUM, después de las inmunizaciones IVAG e IR (Figura 1). Además, se hallaron respuestas CTL sistémicas específicas para gag en SP después de las inmunizaciones IN e IM, pero no después de las inmunizaciones IVAG e IR (Figura 2). Para evaluar la actividad lítica de las respuestas CTL que se detectaron como la cantidad de células secretoras de IFN- γ por el ensayo ELISPOT, se realizó un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional en células CLN y SP después de inmunizaciones IN con partículas SIN-gag. Se observó actividad CTL lítica local y sistémica en CLN y SP después de las inmunizaciones IN con SIN-gag (Figura 3). Por tanto, las inmunizaciones IN o IM, pero no las IVAG o IR, con SIN-gag inducían respuestas CTL locales y sistémicas.

Ejemplo 3

Respuestas CTL después de inmunizaciones en las mucosas frente a sistémicas con SIN-gag después de estimulación con VV-gag

Se determinaron las respuestas CTL locales y sistémicas después de inmunizaciones en las mucosas y sistémicas y estimulación local. (Véase, también, Vajdy y col. (2001) Journal of Infectious Disease 184:1613). Los ratones se inmunizaron IN o IM con $2,5 \times 10^6$ partículas SIN-gag y 1-3 semanas después de la inmunización final se estimularon IR o IVAG con 10^{7-8} pfu de virus vaccinia (VV) que expresaba p55-gag de VIH-1 y se sacrificaron 5 días después de la inmunización final. Se usaron los siguientes controles: un grupo de ratones vírgenes se estimuló IVAG, un grupo de ratones vírgenes se estimuló IR, grupos de ratones se inmunizaron IM, IN, IR o IVAG con SIN-gag y se estimularon IVAG con virus vaccinia que expresaban gp160 de envuelta del virus VIH-1 (VV-env).

Después de las inmunizaciones IM o IN con SIN-gag y estimulación vaginal con VV-gag, se detectaron potentes respuestas CTL específicas para gag en tejidos linfoides locales, CLN, y sistémicos, SP. De forma importante, también se detectaron potentes respuestas CTL en el sitio efector de la mucosa distante, VUM así como en el sitio inductor distante, ILN medidas por el ensayo ELISPOT (Figura 4). Ninguno de los grupos de control mostró respuestas CTL locales o sistémicas (Figura 5). Por tanto, la inyección sistémica en el músculo del muslo así como la administración a las mucosas sobre la mucosa nasal con SIN-gag seguido de estimulación vaginal con VV-gag inducía potentes respuestas CTL no solamente en el sitio inductor local de la mucosa nasal (CLN), sino también en los sitios inductor (ILN) y efector (VUM) distantes de la mucosa vaginal. Además, tanto las inmunizaciones IN como IM con SIN-gag seguidas de estimulación vaginal con VV-gag indujeron potentes respuestas CTL sistémicas.

Para determinar las respuestas CTL locales y sistémicas después de inmunización local y estimulación local, los ratones se inmunizaron IVAG o IR con 10^7 partículas SIN-gag y se estimularon IVAG con 10^7 pfu de VV-gag. Después de las inmunizaciones IR con SIN-gag y estimulación IVAG con VV-gag, se detectaron respuestas CTL locales así como sistémicas en ILN y SP respectivamente, medidas por el ensayo ELISPOT de IFN- γ (Figura 5). En contraste, los ratones inmunizados IVAG con SIN-gag y estimulador IVAG con VV-gag mostraron fuertes respuestas CTL de forma local en ILN y VUM pero bajas respuestas CTL de forma sistémica en SP (Figura 5). Ninguno de los grupos de control mostró ninguna respuesta CTL local o sistémica. Para confirmar la actividad lítica de las respuestas CTL detectadas por la técnica ELISPOT, se realizó un ensayo de liberación de Cr convencional con ILN y SP aislados de ratones inmunizados IR o IVAG con SIN-gag y estimulados IVAG con VV-gag y se obtuvieron resultados similares. Por tanto, las inmunizaciones vaginales y rectales con partículas SIN-gag inducen respuestas CTL locales en los sitios efectores e inductores de las mucosas. Además, la inmunización rectal, pero no la vaginal,

con partículas SIN-gag seguida de estimulación IVAG con VV-gag provocó fuertes respuestas CTL en tejido linfático sistémico.

Ejemplo 4

Protección a partir de estimulación de las mucosas con VV-gag

5 Para determinar si la presencia de respuestas CTL locales y sistémicas se correlacionaban con la protección en las mucosas a partir de diversas estimulaciones, se usó un modelo de estimulación con virus vaccinia que expresaba gag. Se ha demostrado que vaccinia infecta y se replica en los ovarios después de inoculación intrarrectal, y diversas vías de inoculación parenteral. Dos o tres semanas después de las inmunizaciones IR, IVAG, IN o IM con SIN-gag, todos los grupos de ratones se estimularon IVAG con 10^7 pfu de VV-gag. Cinco días después de la
10 estimulación IVAG con VV-gag, los ratones se sacrificaron y se realizó un ensayo de pfu en sus ovarios. Se usaron los siguientes controles: ratones vírgenes estimulados IVAG, ratones vírgenes estimulados IR, grupos de ratones inmunizados IM, IN, IR o IVAG con SIN-gag y estimulados IVAG con virus vaccinia que expresa gp160 de envuelta de VIH-1 (VV-env).

15 Los ratones inmunizados IVAG o IR con SIN-gag estuvieron protegidos contra estimulación IVAG e IR con VV-gag respectivamente, ya que no se detectaron pfu en sus ovarios (Figura 6). Además, los ratones inmunizados IN con SIN-gag y estimulados IVAG con VV-gag estuvieron solamente parcialmente protegidos (Figura 6). De forma importante, los ratones inmunizados IM y estimulados IVAG no estuvieron protegidos (Figura VI). Los ratones vírgenes que se estimularon con VV-gag IR o IVAG tuvieron altos números de pfu en sus ovarios (Figura 6). Además, los ratones que se inmunizaron IM, IN, IR o IVAG con SIN-gag y se estimularon IVAG con VV-env también
20 tuvieron altos títulos de pfu en sus ovarios, lo que demuestra que la protección era específica de antígeno (Figura VI). De forma importante, los ratones inmunizados IM con SIN-gag y estimulados por vía intra-peritoneal con VV-gag estuvieron parcialmente protegidos, lo que demuestra que aunque la inmunización IM no protege contra la estimulación a las mucosas, ofrece algún grado de protección contra la estimulación sistémica (datos no mostrados). Por tanto, la inmunización local/en las mucosas, pero no la distante/en las mucosas o sistémica, protegía a los
25 ratones contra la estimulación local/en las mucosas.

Ejemplo 5

Respuestas de células T CD8⁺ específicas para gag de VIH-1 en la mucosa vaginal y protección contra la estimulación viral vaginal después de inmunizaciones locales con partículas de replicón basadas en el virus Sindbis

30 Se usaron grupos de 5 ratones BALB/c para cada vacuna o vía de inmunización y los tejidos se combinaron después del sacrificio. Los ratones se inmunizaron por diversas vías 3 veces a intervalos de 2 semanas, se dejaron en reposo durante 2-3 semanas y después se estimularon por vía intravaginal (IVAG) o intrarrectal (IR) con 10^7 unidades formadoras de placas (PFU) de VV-gag o VV-gp160 (Gardner y col. (2000) J Virol 74:11849-57). Las partículas SIN-gag se prepararon como se describe en Gardner y col. (2000), *supra*. Las inmunizaciones intranasales (IN) se
35 realizaron sin anestesia con $2,5 \times 10^6$ partículas SIN-gag en un volumen de 25 μ l suspendidas en PBS. Las partículas SIN-gag y el virus VV-gag se aplicaron en ratones anestesiados IVAG o IR en un volumen de 12,5 μ l después de los cual los ratones se mantuvieron en posición recostada dorsal durante 20 minutos. Las inmunizaciones intramusculares (IM) se realizaron en el músculo del muslo con $2,5 \times 10^6$ partículas SIN en un volumen de 50 μ l. Los ratones se sacrificaron 5 días después de la estimulación con VV para la recogida de tejido.

40 Se recogieron los ganglios linfáticos cervicales (CLN), los ILN, los tejidos mucosos vaginales/uterinos (VUM) y los bazo (SP) y se combinaron a partir de 5 ratones por grupo. Se usaron suspensiones celulares sencillas para un ensayo ELISPOT para detectar las células secretoras de IFN- γ (IFNSC) específicas para el péptido p7g derivado de gag de VIH-1. Cinco días después de la estimulación vaginal o rectal con VV-gag, se recogieron y combinaron los SP, CLN e ILN de los grupos de 5 ratones inmunizados cada uno. Los tejidos SP, CLN e ILN se separaron a través
45 de una malla de nylon con un diámetro de poro de 250 μ m y se lavaron tres veces en las medias (medios de ensayo ELISPOT: RPMI que contenía FCS al 10%, antibióticos, HEPES y L-glutamina (RPMI completo)), se contaron y se sembraron en pocillos para el ensayo ELISPOT. Se prepararon suspensiones celulares sencillas a partir de VUM en base al procedimiento descrito por Johansson y col. (1998) Infect. Immun 66:514-520. Este procedimiento provocaba de forma rutinaria la recuperación de un mínimo de 10^7 , un mínimo del 90% de células mononucleares (MNC)
50 viables por cinco ratones.

Se ha demostrado que el péptido p7g derivado de gag de VIH-1 se reconoce por células T CD8⁺ (Doe y Walker (1996) AIDS 10:793-94). También se demostró que el péptido solamente se reconocía por células T CD8⁺ y no por células T CD4⁺, después de la tinción con la citoquina intracelular IFN- γ específica para p7g de células CD4⁺ y CD8⁺ después de las inmunizaciones con ADN. Se prepararon suspensiones celulares sencillas a partir de VUM, ILN, CLN o SP combinados de 5 ratones por grupo y se ajustaron a concentraciones de 10^7 a 3×10^7 por ml. Se añadieron 100
55 μ l de cada preparación celular sobre la primera fila de placas de nitrocelulosa o pvdf de 96 pocillos (Milipore) por duplicado y se realizaron diluciones en serie de factor 2. Después de incubación durante una noche a 37°C, las placas se lavaron y se añadió anticuerpo anti-IFN- γ biotinilado (PharMingen). Las placas después se incubaron a

temperatura ambiente durante 2 horas y se lavaron. Después se añadió avidina-peroxidasa (PharMingen) a las placas y se incubaron durante 30 min. a 37°C y se lavaron. Las placas se revelaron con solución de aminoetil carbazol (Sigma) durante 30 min. Los resultados de 3 experimentos independientes se presentan como la media ($\pm$ DT) de células secretoras de IFN- γ por 10 millones de células mononucleares (MNC) a partir de un mínimo de 4 pocillos a partir de combinaciones de 5 ratones por grupo por duplicado.

A. Respuestas en las mucosas y sistémicas de células T CD8⁺ después de inmunizaciones en las mucosas o sistémicas con SIN-gag seguidas de estimulación vaginal con virus vaccinia-gag

La estimulación vírica después de la inmunización no solamente potencia la respuesta inmune sino que también permite obtener una correlación entre la respuesta inmune y la protección. Por lo tanto, los ratones se sensibilizaron con SIN-gag a través de las vías IN, IM, IR o IVAG y después se estimularon con VV-gag. Se midieron las respuestas CTL en las mucosas y sistémicas así como la protección contra la replicación de VV-gag en los ovarios. Los ratones inmunizados IN, IM e IVAG se estimularon IVAG, mientras que los ratones que se inmunizaron IR se estimularon IR o IVAG. Los resultados de las respuestas de células T CD8⁺ en las mucosas y sistémicas en VUM, ILN y SP de ratones inmunizados IN o IM y estimulados IVAG medidas por el ensayo ELISPOT de IFN- γ se muestran en las Figuras 11A y 11B, respectivamente. Ninguna respuesta de células T CD8⁺ fue detectable en CLN de cualquier grupo. Estas respuestas eran específicas para gag ya que la estimulación IVAG o IR de ratones vírgenes con VV-gag, o la estimulación IVAG o IR de ratones inmunizados con SIN-gag con VV-gp160 no indujo respuestas de células T CD8⁺. Estos datos muestran que la estimulación vaginal con VV de ratones inmunizados IN o IM inducía respuestas de células T CD8⁺ en VUM e ILN.

Después de la inmunización IR con SIN-gag seguida de estimulación IVAG con VV-gag, las respuestas más altas de células T CD8⁺ se hallaron en ILN y SP, y se hallaron respuestas relativamente bajas en VUM (Figura 11C). Asimismo, después de la inmunización IVAG con SIN-gag seguida de estimulación IVAG con VV-gag, las respuestas más altas de células T CD8⁺ se hallaron en ILN y SP, y respuestas relativamente bajas en VUM (Figura 11D). Las respuestas de células T CD8⁺ observadas después de las inmunizaciones y la estimulación IVAG o IR eran generalmente 10 veces inferiores en comparación con las respuestas de células T CD8⁺ observadas después de las inmunizaciones IN e IM seguidas de estimulación IVAG.

B. Protección contra la replicación vírica local después de inmunizaciones en las mucosas con SIN-gag seguidas de estimulación vaginal con virus vaccinia-gag

También se ensayó la protección contra la replicación del virus vaccinia en los ovarios de ratones sensibilizados a través de diversas vías después de estimulación IVAG o IR con virus, usando un ensayo de PFU convencional. Como se muestra en la Figura 12, los ratones sensibilizados IM con SIN-gag no estuvieron protegidos contra la estimulación con VV-gag IVAG. Además, 5 de los 19 ratones sensibilizados IN no mostraron evidencias de replicación de VV en sus ovarios. En contraste, después de la estimulación IVAG o IR con VV-gag, los ratones sensibilizados IVAG o IR con SIN-gag estuvieron completamente protegidos contra la estimulación IVAG (Figura 12) e IR con VV-gag respectivamente, ya que no se detectó replicación del virus vaccinia en sus ovarios. Los ratones vírgenes de control tuvieron elevados niveles de VV en sus ovarios después de la estimulación IR o IVAG con VV-gag (Figura 12). Además, los ratones de control que se inmunizaron IN, IM, IVAG e IR con SIN-gag y se estimularon IVAG con VV-gp160 tuvieron elevados niveles de VV en sus ovarios (Figura 12), lo que demuestra que la protección era específica para gag. Por tanto, la inmunización local en las mucosas, pero no la inmunización distante en las mucosas o sistémica, con partículas de replicón SIN-gag confería protección máxima contra la estimulación vírica vaginal.

Por tanto, la inmunización IVAG o IR en las mucosas confería protección contra la estimulación vírica vaginal. Además, los datos indican que los replicones basados en alfavirus proporcionan un mecanismo eficaz para inducir dicha protección local. La comparación de las vías de inmunización distante a las mucosas (IN), local a las mucosas (IVAG e IR) y sistémica (IM) con partículas de replicón SIN-gag, seguida de estimulación local en las mucosas con VV-gag, demostró que las vías de inmunización IN e IM inducían mayores respuestas mediadas por células T CD8⁺ en las mucosas específicas para gag en la mucosa vaginal (VUM), los ganglios linfáticos de drenaje (ILN), y en SP. Sin embargo, las inmunizaciones IVAG e IR conferían protección máxima contra la estimulación vaginal con VV-gag. Además, las respuestas eran específicas para gag ya que la inmunización con SIN-gag seguida de estimulación vaginal con VV-gp160 no inducía ni respuestas de células T CD8⁺ secretoras de IFN- γ específicas para gag, ni tenía ningún impacto sobre la replicación de VV en los ovarios. La estimulación IVAG de ratones vírgenes con VV-gag tampoco lograba inducir ninguna respuesta de células T CD8⁺ IFN- γ específicas para gag detectable. Por lo tanto, la inducción de respuestas de células T CD8⁺ IFN- γ era específica para gag y como resultado de las respuestas específicas adaptables después de la inmunización con SIN-gag. La estimulación con VV-gag no estaba mediada por respuestas humorales como se indica por el hecho de que los títulos séricos específicos para gag (medidos por ELISA dos semanas después de las inmunizaciones en las mucosas con replicones SIN-gag) eran indetectables en suero anti-gag. Por tanto, la protección observada era un resultado de las respuestas mediadas por células T específicas para gag.

En resumen, los resultados demuestran que el sistema de suministro de replicones SIN puede aplicarse a las mucosas para la inducción de respuestas de células T CD8⁺ e inmunidad protectora contra el VIH. Estos resultados

tienen implicaciones importantes para los patógenos transmitidos por vía sexual en general, así como para terapia génica terapéutica contra cánceres cervicales, de colon, y pulmonares.

Ejemplo 6

Identificación de células que expresan gag de VIH-1 en tejidos linfoides locales y sistémicos

- 5 Las células que están implicadas en la captación y expresión de las partículas SIN-gag en los tejidos linfoides locales y sistémicos después de la inmunización en las mucosas se identificaron inmunizando IN a ratones con una única dosis de partículas SIN-gag. Se tiñeron secciones congeladas de tejido linfoide asociado con el nasal (NALT), CLN y SP con un anticuerpo contra gag. En 1 día después de la inmunización, se hallaron muchas células que expresan gag tanto de forma local en NALT (Figura 9) como CLN (Figura 10) así como de forma sistémica en SP (Figura 11), aunque con mucho la mayoría de las células aparecían localizadas en SP. Para identificar las células que expresan gag, las células se tiñeron doblemente con CD11b o CD11c como marcadores para células del linaje de monocitos con actividad APC potencial, y B220, un marcador para células B. La mayoría de las células que expresan gag co-expresaban CD11b, mientras que solamente unas pocas co-expresaban CD11c. De forma importante, ninguna célula B220⁺ co-expresaba gag y las células CD11b⁺ o CD11c⁺ que expresaban gag estaban en áreas de células T extra-foliculares. Por tanto, en momentos puntuales tempranos después de las inmunizaciones, las células CD11b⁺ son las células mayoritarias con APC potencial para expresar gag en tejidos linfoides tanto locales como sistémicos.

Ejemplo 7

Respuestas humorales en los sueros después de inmunizaciones intranasales

- 20 También se determinó la capacidad de los replicones SIN de inducir la producción de anticuerpos.

A. Antígenos derivados de VIH

- Dos semanas después de 3 inmunizaciones IN con replicones SIN que expresaban gag, se midieron los títulos séricos por ELISA (Figura 12). Además, se realizaron experimentos de sensibilización-refuerzo. Primero, después de 3 inmunizaciones IN con SIN-gag, los ratones se reforzaron IN tres veces a intervalos de 4 semanas con p24 más LTK63. Además, se realizaron experimentos en los que los animales se sensibilizaron con SIN que expresaba gp140 de envuelta de VIH y se reforzaron con Ogp140 más el adyuvante de mucosa LTR72 y CpG. En estos casos particulares, se observaron niveles bajos o ausentes de títulos de anticuerpo (Figura 10), lo que indica que la protección observada después de las inmunizaciones vaginales o rectales con gag no estaba mediada por anticuerpo.

B. Antígenos derivados del virus de la influenza

- Dos semanas después de 1 o más inmunizaciones en las mucosas (por ejemplo, IN, IVAG, IR) con replicones SIN que expresan el o los polipéptidos de la influenza (HA), se miden los títulos séricos por ELISA. Además, se realizan experimentos de sensibilización-refuerzo. Primero, después de las inmunizaciones a las mucosas con SIN-HA, los ratones se refuerzan en las mucosas uno o más veces con HA más LTK63. Además, se realizan experimentos en los que los animales se sensibilizan con SIN que expresan antígenos HA y se refuerzan con polipéptidos HA más el adyuvante de mucosa LTR72 y CpG. Los replicones SIN-HA inducirán la producción de anticuerpos cuando se administren a las mucosas.

Ejemplo 8

Inducción de respuestas inmunes después del suministro a las mucosas de quimeras de partículas de replicón alfaviral

- Para demostrar la capacidad de las quimeras de partículas de replicón alfaviral de inducir respuestas inmunes específicas de antígeno después del suministro a las mucosas, se realizaron experimentos de inmunización intranasal similares a los descritos anteriormente. Específicamente, se construyeron quimeras de partículas de replicón entre SIN y VEE, como se describe en el documento de Estados Unidos con número de serie 60/295.451, de modo que se empaquetara el ARN del replicón SIN dentro de glucoproteínas de envuelta de VEE (SIN/VEE) o se empaquetara el ARN del replicón VEE dentro de glucoproteínas de envuelta SIN (VEE/SIN). Estas partículas de replicón que codifican el antígeno p55 gag del VIH, así como partículas de replicón SIN y partículas de replicón VEE que también codifican el mismo antígeno gag del VIH se usaron para inmunizar ratones por vía intranasal.

- Las partículas de replicón se administraron tres veces, a una dosis de $2,5 \times 10^6$ partículas en 25 μ l, con un programa de inmunización de los días 0, 14, y 28. A las dos semanas después de la inmunización final, se retiraron los bazos y se determinaron las respuestas celulares específicas para gag por ensayo ELISPOT de IFN- γ . Como se muestra en la Figura 13, cada una de las preparaciones de partículas de replicón inducía respuestas específicas para gag, con alguna variación en la inmunogenicidad.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una partícula de replicón alfaviral deficiente en la replicación que contiene una construcción de vector alfaviral que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica al menos un primer antígeno o forma modificada del mismo, siendo capaz dicho primer antígeno o forma modificada del mismo de estimular una respuesta inmune en un sujeto cuando se administra por vía intranasal, donde dicha partícula de replicón alfaviral deficiente en la replicación es una partícula alfaviral quimérica que contiene una construcción de vector del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) empaquetada con glucoproteínas de envuelta del virus Sindbis (SIN), para su uso en un procedimiento terapéutico para tratar a un sujeto mamífero generando una respuesta inmune en el sujeto por administración intranasal.
- 2.- Uso de una partícula de replicón alfaviral deficiente en la replicación que contiene una construcción de vector alfaviral que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica al menos un antígeno o forma modificada del mismo, siendo capaz dicho primer antígeno o forma modificada del mismo de estimular una respuesta inmune en el sujeto cuando se administra por vía intranasal, donde dicha partícula de replicón alfaviral deficiente en la replicación es una partícula alfaviral quimérica que contiene una construcción de vector del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) empaquetada con glucoproteínas de envuelta del virus Sindbis (SIN), en la preparación de un medicamento para tratar de forma terapéutica a un sujeto mamífero generando una respuesta inmune en el sujeto por administración intranasal.
- 3.- La partícula de replicón alfaviral de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que el al menos un antígeno se obtiene de un patógeno de transmisión sexual.
- 4.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 3, en la que el patógeno de transmisión sexual es una bacteria.
- 5.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 4, en la que la bacteria se selecciona entre el grupo que consiste en gonorrea, clamidia y sífilis.
- 6.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 3, en la que el patógeno de transmisión sexual es un virus.
- 7.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 6, en la que el virus se selecciona entre el grupo que consiste en VIH, VHB, VHS, VHC y VPH.
- 8.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 7, en la que el virus es VIH-1.
- 9.- La partícula de replicón alfaviral de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que el al menos un primer antígeno es un antígeno gag del VIH.
- 10.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 9, en la que el al menos un primer antígeno comprende un epítipo CTL p24 gag de VIH-1 restringido a H-2K^d.
- 11.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 10, en la que el epítipo CTL p24 gag de VIH-1 restringido a H-2K^d consta de la secuencia AMQMLKETI.
- 12.- La partícula de replicón alfaviral o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 6-11, para prevenir, inhibir, estabilizar o revertir el VIH.
- 13.- La partícula de replicón alfaviral de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que el al menos un primer antígeno es un antígeno de hemaglutinina (HA) de la influenza.
- 14.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el sujeto es un mamífero.
- 15.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 14, en la que el mamífero es un ser humano.
- 16.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el vector alfaviral se suministra a células presentadoras de antígeno.
- 17.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 16, en la que las células presentadoras de antígeno son células dendríticas.
- 18.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 17, en la que las células dendríticas son humanas.
- 19.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que las células diana se infectan *in vivo*.
- 20.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que el antígeno provoca una respuesta inmune restringida al HLA clase I.

21.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 20, en la que el antígeno provoca adicionalmente una respuesta inmune restringida al HLA clase II.

5 22.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que incluye, antes o después de la etapa de administración a las células diana, introducir en las células diana una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína MHC de clase I o clase II, o combinaciones de las mismos, o una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en CD3, ICAM-1, LFA-3 o análogos de las mismas.

10 23.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende adicionalmente la etapa de administrar al menos un segundo vehículo de suministro génico, comprendiendo dichos segundo vehículo de suministro génico polinucleótidos que codifican al menos un segundo antígeno o forma modificada del mismo o un factor inmunomodulador.

24.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 23, en la que el segundo vehículo de suministro génico se administra a las mucosas.

25.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 23, en la que el segundo vehículo de suministro génico se administra no a las mucosas.

15 26.- La partícula de replicón alfaviral o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende adicionalmente la etapa de administrar uno o polipéptidos al sujeto.

27.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 26, en la que los polipéptidos comprenden al menos un segundo antígeno o forma modificada del mismo.

20 28.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 26, en la que los polipéptidos comprenden un factor inmunomodulador.

29.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 26, en la que al menos uno de los polipéptidos se administra a las mucosas.

30.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 26, en la que al menos uno de los polipéptidos se administra no a las mucosas.

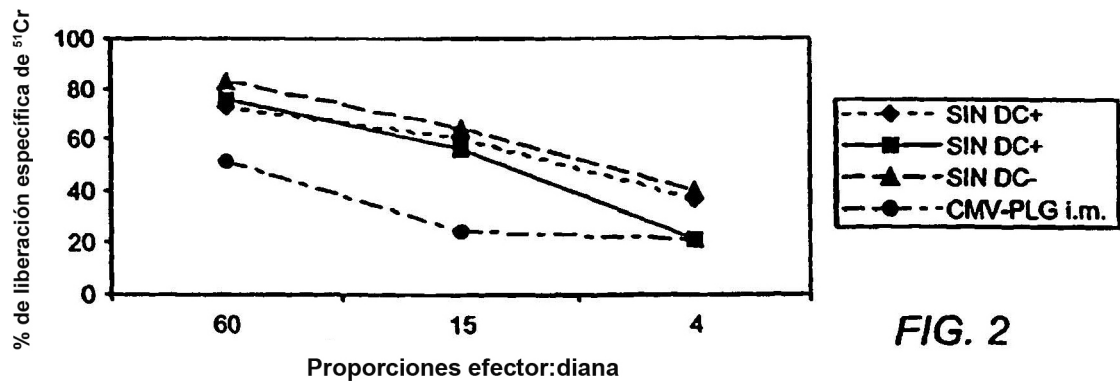
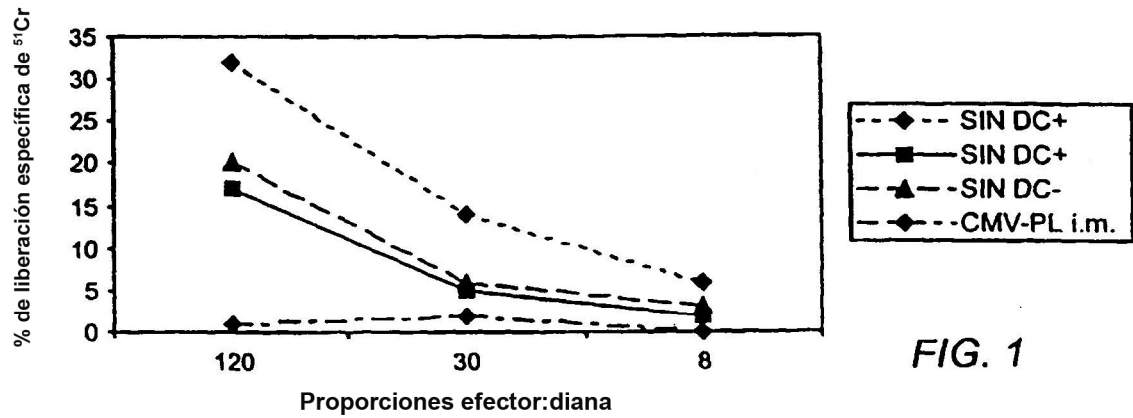
25 31.- La partícula de replicón alfaviral o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la que el medicamento es para administración con un mutante destoxificado de una toxina ADP-ribosilante bacteriana.

32.- La partícula de replicón alfaviral o uso de la reivindicación 31, en la que el mutante destoxificado de una toxina ADP-ribosilante bacteriana se selecciona entre el grupo que consiste en la toxina colérica, la toxina pertussis y la toxina inestable al calor de *E. coli*.

30

35

40



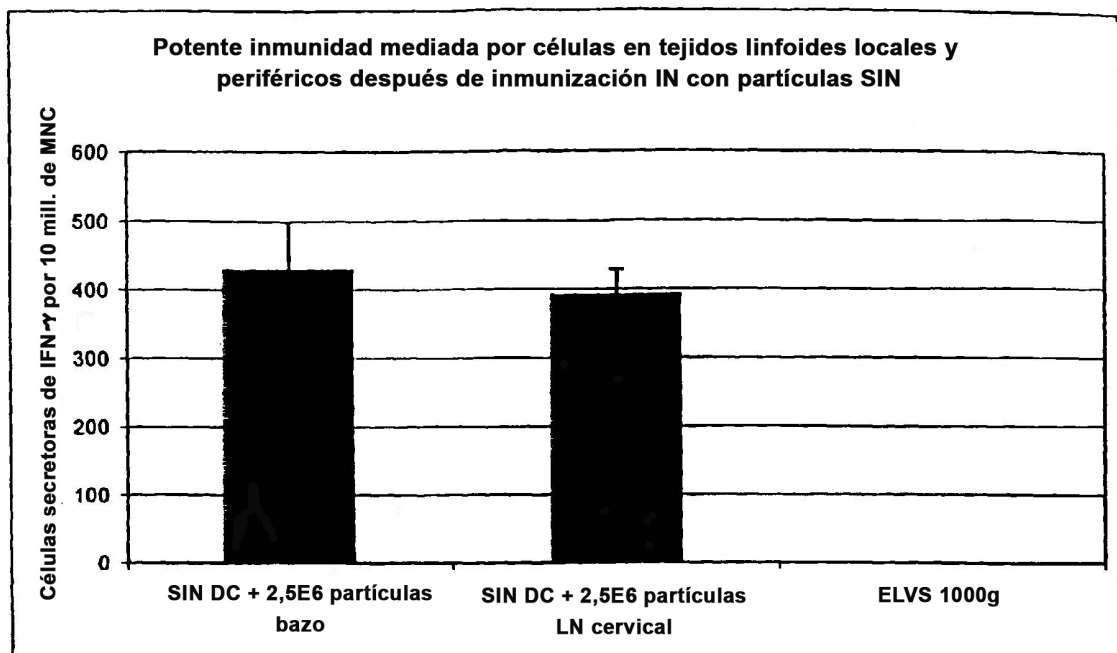
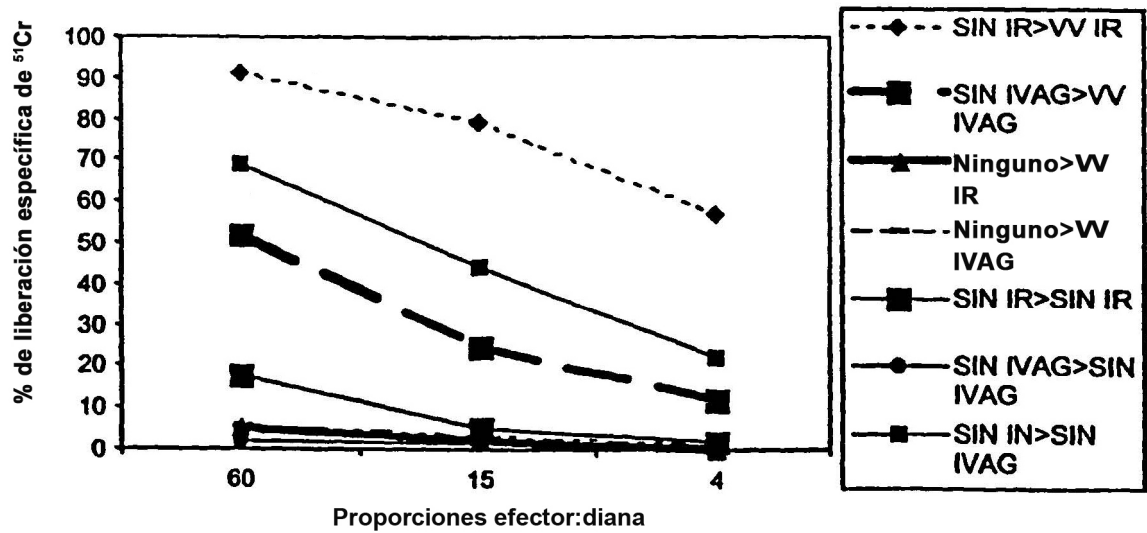
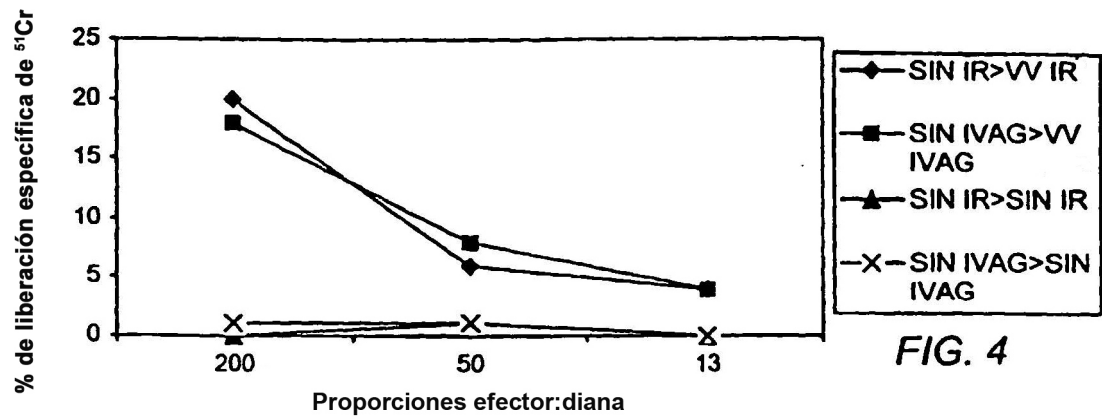


FIG. 3



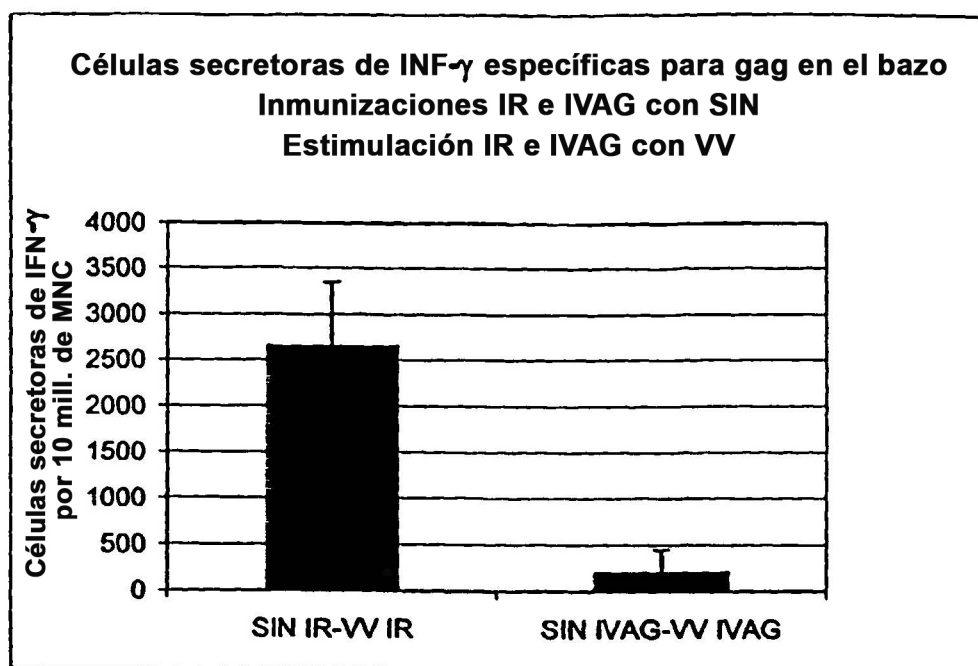


FIG. 6

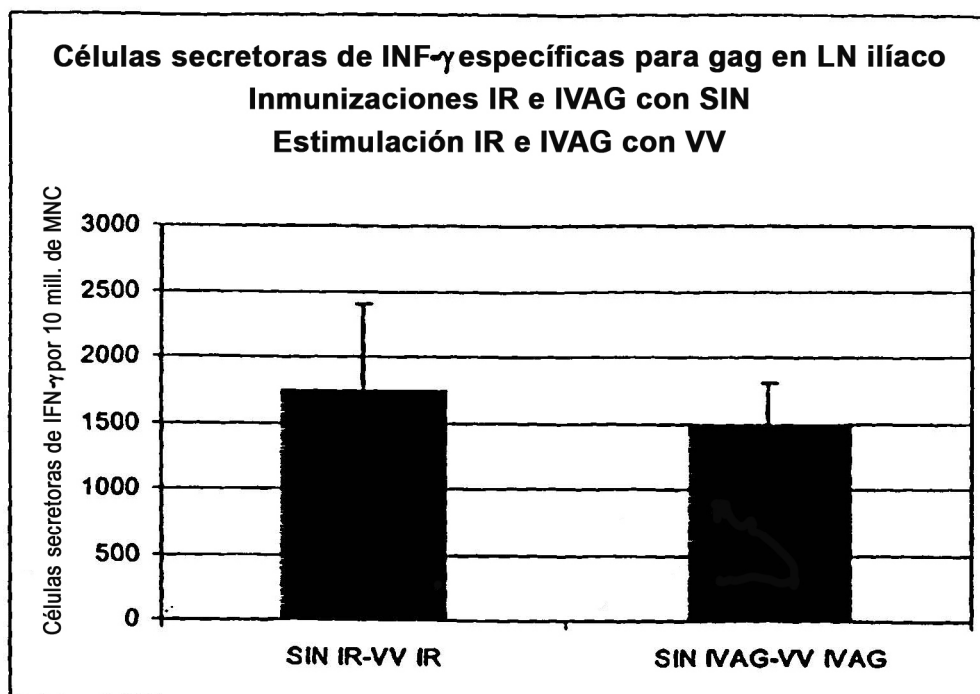


FIG. 7

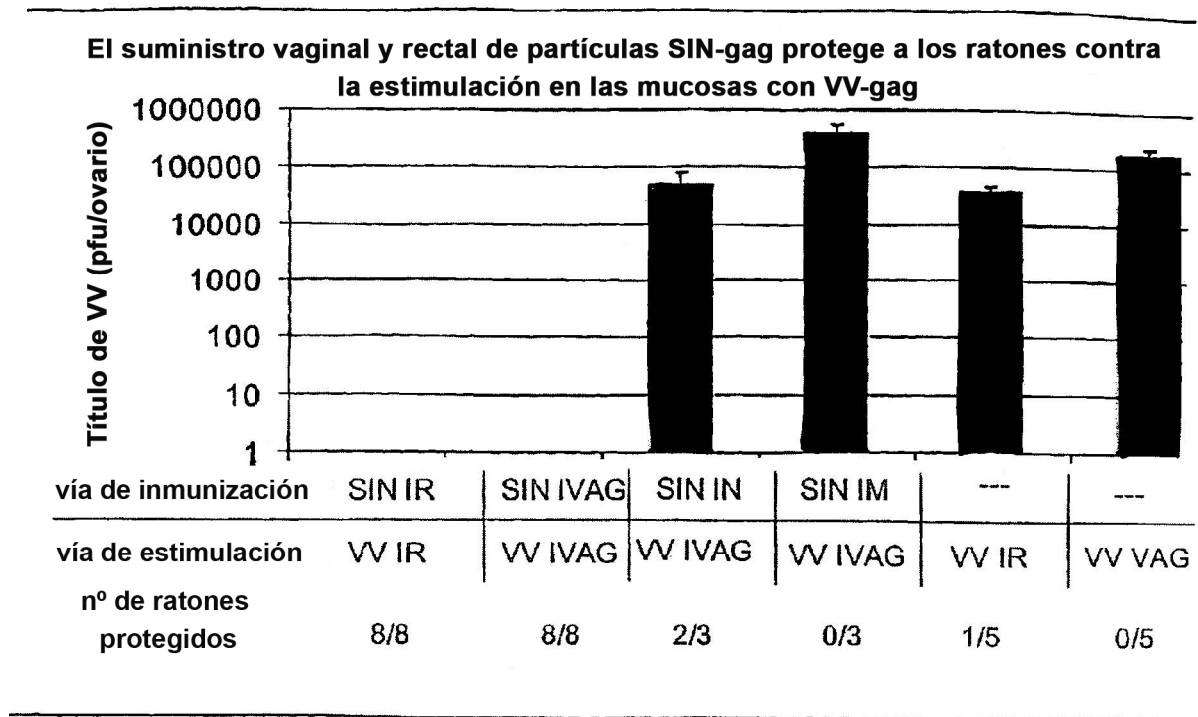
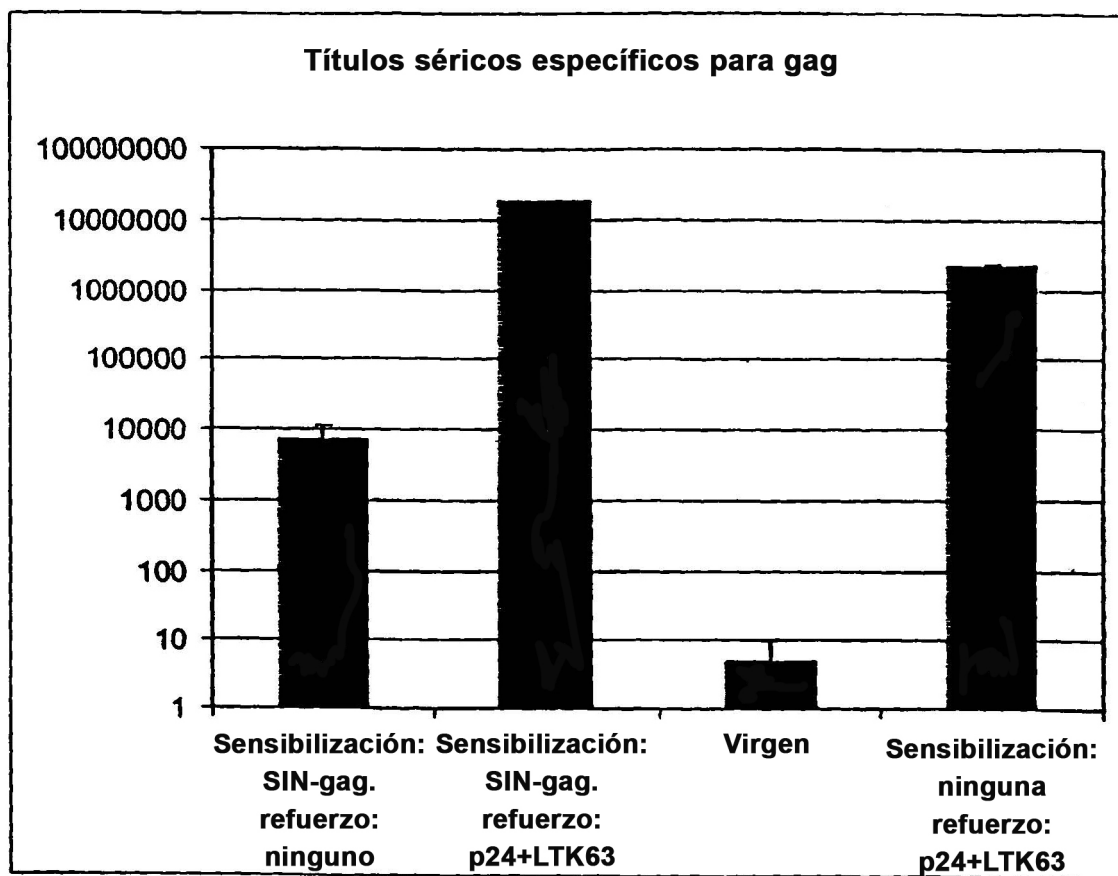
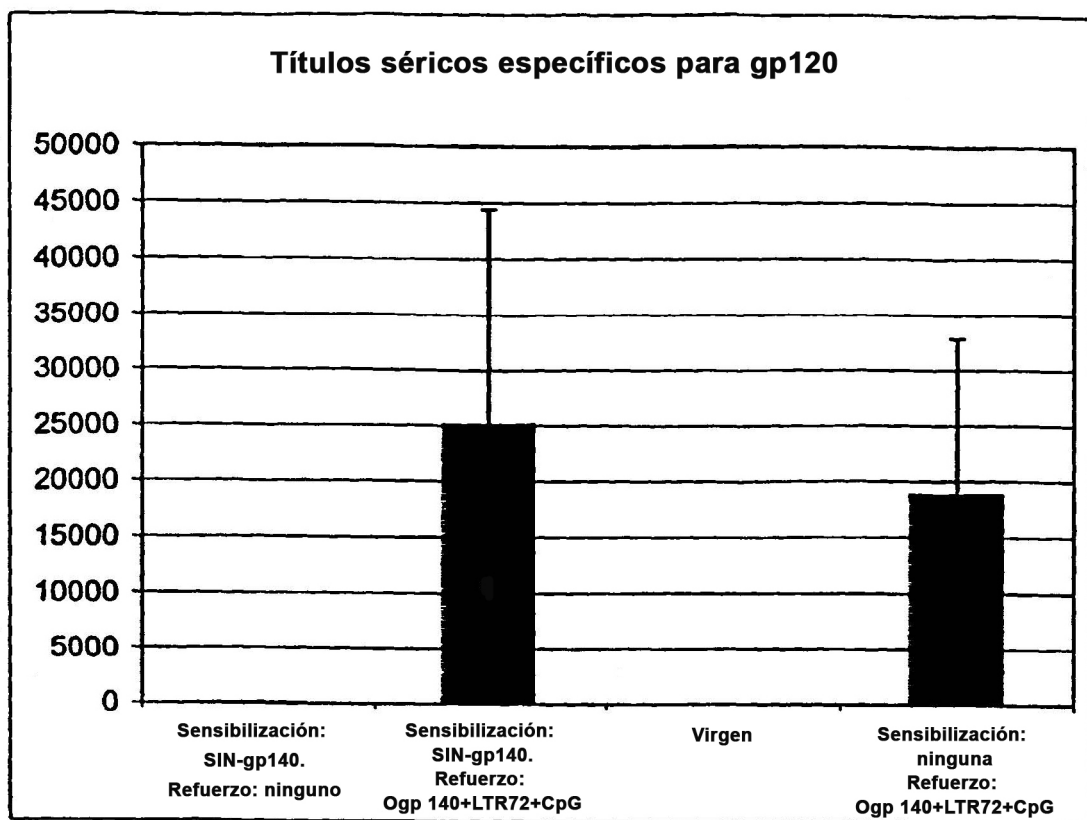
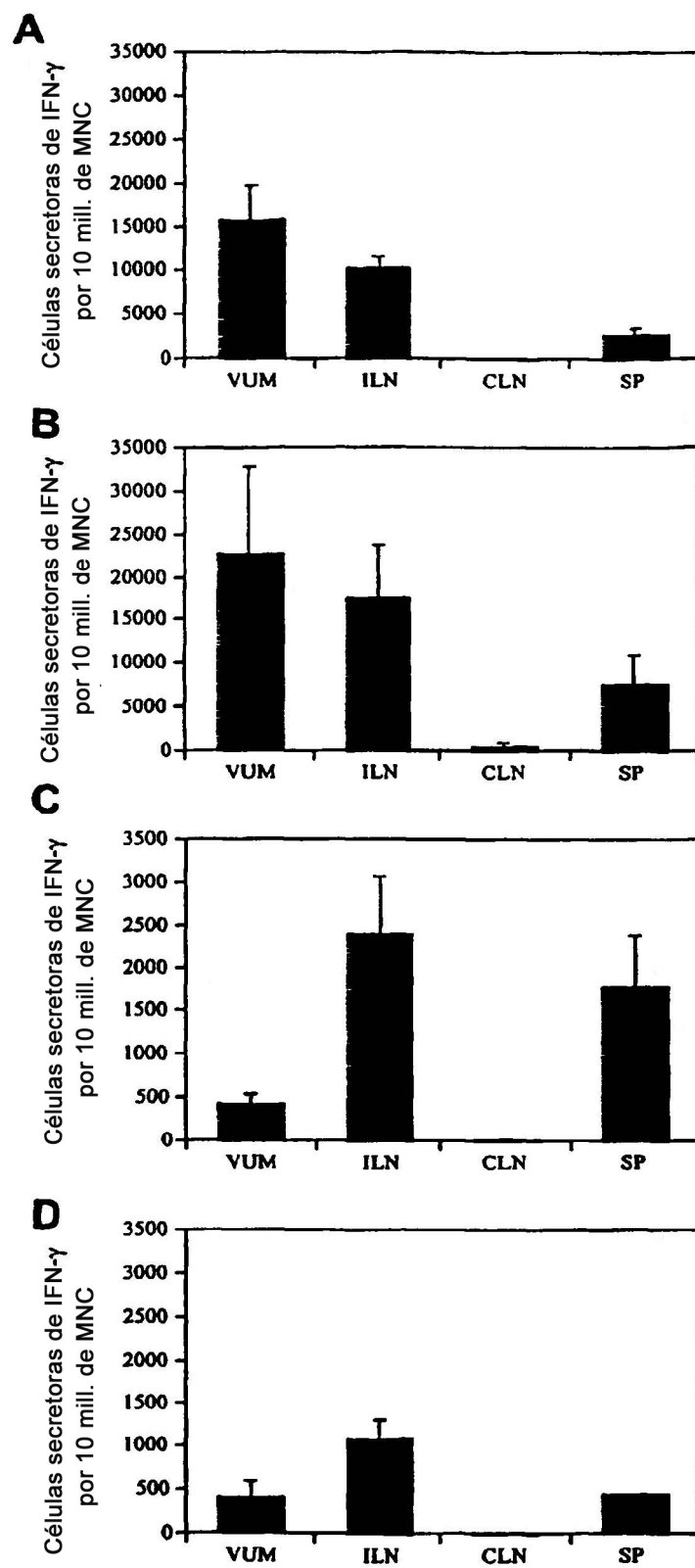


FIG. 8

**FIG. 9**

**FIG. 10**

**Figura 11**

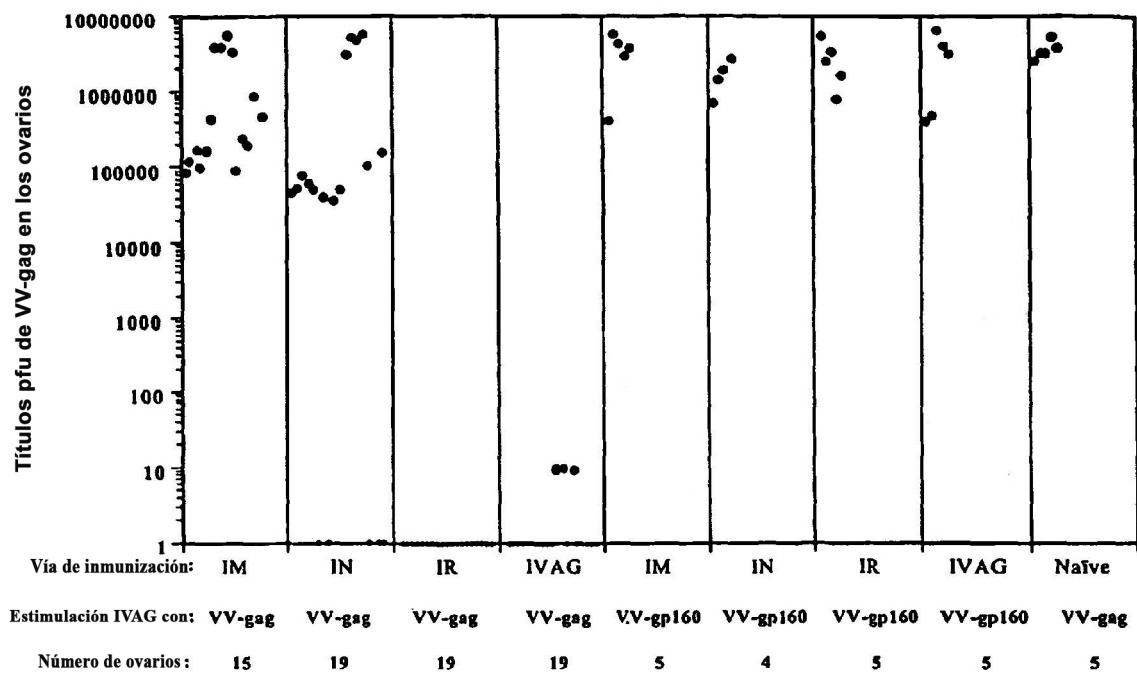


Figura 12

FIGURA 13

