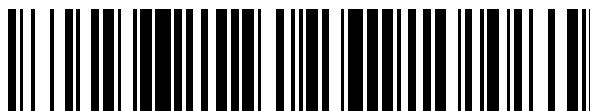


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 458**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07762574 .7**
96 Fecha de presentación: **12.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1976871**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **VACUNAS Y AGENTES INMUNOTERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN IL-15 OPTIMIZADA EN CODONES, Y MÉTODOS PARA UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
13.01.2006 US 758856 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2012

73 Titular/es:
**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA
3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:
**WEINER, David, B. y
KUTZLER, Michele**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 458 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas y agentes inmunoterapéuticos que utilizan IL-15 optimizada en codones, y métodos para utilización de los mismos.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia de ácido nucleico optimizada en codones que codifica IL-15, vacunas mejoradas, métodos mejorados para inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente individuos contra inmunógenos, y a composiciones inmunoterapéuticas mejoradas y métodos mejorados de inmunoterapia.

Antecedentes de la invención

- 10 La inmunoterapia se refiere a la modulación de las respuestas inmunes de una persona para impartir un efecto terapéutico deseable. Los agentes inmunoterapéuticos hacen referencia a aquellas composiciones que, cuando se administran a un individuo, modulan el sistema inmunológico del individuo lo suficiente para reducir finalmente los síntomas que están asociados con respuestas inmunes indeseables o aliviar finalmente los síntomas por aumento de respuestas inmunes deseables. En algunos casos, la inmunoterapia forma parte de un protocolo de vacunación en el cual se administra al individuo una vacuna que expone el individuo a un inmunógeno contra el cual el individuo genera una respuesta inmune. En tales casos, el agente inmunoterapéutico aumenta la respuesta inmune y/o mejora selectivamente una porción de la respuesta inmune (tal como la rama celular o la rama humoral) que es deseable para tratar o prevenir la afección, infección o enfermedad particular.

- 15 Las vacunas son útiles para inmunizar individuos contra antígenos diana tales como alérgenos, antígenos patógenos o antígenos asociados con células implicadas en enfermedades humanas. Los antígenos asociados con células implicadas en enfermedades humanas incluyen antígenos tumorales asociados con el cáncer y antígenos asociados con células implicadas en enfermedades autoinmunes.

- 20 En el diseño de tales vacunas, se ha reconocido que las vacunas que producen el antígeno diana en las células del individuo vacunado son eficaces para inducir la rama celular del sistema inmunológico. Específicamente, las vacunas vivas atenuadas, vacunas recombinantes que utilizan vectores avirulentos, y vacunas de DNA conducen cada una a la producción de antígenos en la célula del individuo vacunado, lo cual da como resultado la inducción de la rama celular del sistema inmunológico. Por otra parte, las vacunas muertas o desactivadas, y las vacunas de subunidades que comprenden únicamente proteínas no inducen respuestas inmunitarias celulares satisfactorias aun cuando inducen una respuesta humoral.

- 25 Una respuesta inmune celular es a menudo necesaria para proporcionar protección contra infecciones por patógenos y para proporcionar una terapia eficaz mediada por inmunidad para tratamiento de infecciones causadas por patógenos, cáncer o enfermedades autoinmunes. De acuerdo con ello, se prefieren a menudo vacunas que producen el antígeno diana en las células del individuo vacunado tales como vacunas vivas atenuadas, vacunas recombinantes que utilizan vectores avirulentos, y vacunas de DNA.

- 30 Si bien tales vacunas son eficaces a menudo para inmunizar individuos profiláctica o terapéuticamente contra infección por patógenos o enfermedades humanas, existe necesidad de vacunas mejoradas. Existe necesidad de composiciones y métodos que produzcan una respuesta inmune mejorada.

Análogamente, si bien algunos agentes inmunoterapéuticos son útiles para moderar la respuesta inmune en un paciente, persiste la necesidad de composiciones y métodos inmunoterapéuticos mejorados.

40 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína IL-15 que comprende SEQ ID NO: 1.

- 45 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden SEQ ID NO: 1 que están exentas de secuencia codificante para una secuencia de señal de IL-15 y/o exentas de la región Kozak de IL-15 y/o la región 5' no traducida de IL-15 y/o la región 3' no traducida de IL-15 y/o que comprenden una secuencia codificante de una secuencia de señal distinta de IL-15.

La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 que comprende SEQ ID NO: 1 y que comprenden adicionalmente una secuencia codificante de un inmunógeno.

- 50 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1 y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno.

La presente invención se refiere adicionalmente a métodos de modulación de una respuesta inmune en un individuo que comprenden administrar a dicho individuo una molécula de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1.

La presente invención se refiere adicionalmente a vacunas recombinantes que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1.

- 5 La presente invención se refiere a métodos de inducción de una respuesta inmune en un individuo contra un inmunógeno que comprenden administrar a dicho individuo una molécula de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1 como parte o en combinación con una molécula de ácido nucleico que codifica un inmunógeno o en combinación con un inmunógeno.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra SEQ ID NO: 1.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Definiciones

- 15 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "proteína diana" hace referencia a péptidos y proteínas codificados por constructos génicos de la presente invención que actúan como proteínas diana para una respuesta inmune. Los términos "proteína diana" e "inmunógeno" se utilizan intercambiamente y hacen referencia a una proteína contra la cual puede suscitarse una respuesta inmune. La proteína diana es una proteína inmunógena que comparte al menos un epítotope con una proteína del patógeno o tipo de célula indeseable tal como una célula de cáncer o una célula implicada en una enfermedad autoinmune contra la cual se desea una respuesta inmune. La respuesta inmune dirigida contra la proteína diana protegerá al individuo contra y/o tratará el individuo en lo referente a la infección o enfermedad específica con la cual está asociada la proteína diana.

- 20 Como se utiliza en esta memoria, el término "constructo genético" hace referencia a moléculas de DNA o RNA que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína diana o proteína inmunomoduladora. La secuencia codificante incluye señales de iniciación y terminación enlazadas operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico.

- 25 Como se utiliza en esta memoria, el término "forma expresable" se refiere a constructos génicos que contienen los elementos reguladores necesarios enlazados operativamente a una secuencia codificante que codifica una proteína diana o una proteína inmunomoduladora, de tal modo que cuando está presente en la célula o el individuo, la secuencia codificante se expresará.

- 30 Como se utiliza en esta memoria, el término "compartición de un epítotope" se refiere a proteínas que comprenden al menos un epítotope que es idéntico a o sustancialmente similar a un epítotope de otra proteína.

Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que hace referencia a un epítotope que tiene una estructura que no es idéntica a un epítotope de una proteína pero que sin embargo suscita una respuesta inmune celular o humoral que reacciona de modo cruzado con dicha proteína.

- 35 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "patógeno intracelular" hace referencia a un virus u organismo patógeno que, al menos en parte de su ciclo reproductivo o ciclo vital, existe dentro de una célula hospedadora y en el cual produce o hace que se produzcan proteínas patógenas.

Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "enfermedades hiperproliferativas" hace referencia a aquellas enfermedades y trastornos caracterizados por hiperproliferación de células.

- 40 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "proteína asociada con la hiperproliferación" hace referencia a proteínas que están asociadas con una enfermedad hiperproliferativa.

- 45 Como se utiliza en esta memoria, el término "proteína inmunomoduladora" hace referencia a una proteína que modula el sistema inmunológico de una persona a la que se suministra la proteína inmunomoduladora. Ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen: IL-15, CD40L, TRAIL; TRAILrecDRC5, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, F461811 o MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, CD30, CD153 (CD30L), Fos, c-jun, Sp-1, Apl, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, NIK, SAP K, SAP1, JNK2, JNK1B2, JNK1B1, JNK2B2, JNK2B1, JNK1A2, JNK2A1, JNK3A1, JNK3A2, NF-kappa-B2, p49 forma remodelada, NF-kappa-B2, p100 forma remodelada, NF-kappa-B2, p105 forma remodelada, NF-kappa-B 50K precursor de cadena, NFκB p50, IL-1 α humana, IL-2 humana, IL-4 humana, IL-4 murina, IL-5 humana, IL-10 humana, IL-15 humana, IL-18 humana, TNF- α humana, TNF-β humana, interleuquina 12 humana, MadCAM-1, NGF IL-7, VEGF, TNF-R, Fas, CD40L, IL-4, CSF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, LFA-3, ICAM-3, ICAM-2, ICAM-1, PECAM, P150.95, Mac-1, LFA-1, CD34, RANTES, IL-8, MIP-1α, E-selectina, CD2, MCP-1, L-selectina, P-selectina, FLT, Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4(TRAIL), DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, ICE, VLA-1, y CD86 (B7.2).

Visión de Conjunto

La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 que proporciona una expresión mejorada de proteínas con relación a la secuencia nativa. La secuencia codificante de IL-15 mejorada puede utilizarse en combinación con los descubrimientos expuestos en la solicitud PCT/US04/18962 presentada el 14 de junio de 2004, la Solicitud Provisional U.S. Número 60/478210 presentada el 13 de junio de 2003 y la Solicitud Provisional U.S. Número 60/478205 presentada el 13 de junio de 2003, particularmente aquéllas que proporcionan secuencias codificantes de la proteína IL-15 enlazadas a un péptido de señal distinto de IL-15, particularmente el péptido de señal IgE, y al uso de tales constructos en vacunas y en constructos para el suministro de la proteína IL-15 como proteína inmunomoduladora. En algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona vectores, vacunas y composiciones inmunomoduladoras y métodos que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, tales moléculas de ácido nucleico se proporcionan exentas de secuencias codificantes para la secuencia de señal de IL-15, y más preferiblemente exentas de la región Kozak de IL-15 y regiones no traducidas. En algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona vectores, vacunas y composiciones inmunomoduladoras y métodos que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprenden SEQ ID NO: 1 que están unidas a secuencias codificantes para la secuencia de señal de IgE humana.

Secuencias nativas que codifican IL-15 han sido modificadas para mejorar la expresión. En mejoras anteriores, elementos tales como secuencias codificantes para la secuencia IL-15 y regiones no traducidas se deletaron para mejorar la expresión. Estas mejoras anteriores pueden incorporarse y utilizarse en conjunción con la secuencia codificante mejorada de la proteína IL-15 madura indicada en SEQ ID NO: 1. En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico que incluye SEQ ID NO: 1 está exenta de la secuencia codificante para el péptido señal de IL-15, y preferiblemente se proporciona en su lugar otra proteína de señal tal como la proteína de señal de IgE. Además, la región Kozak de IL-15 y regiones no traducidas se retiran también para eliminar elementos inhibidores. Las únicas secuencias de IL-15 que incluyen preferiblemente los constructos son las secuencias de IL-15 que codifican la secuencia de aminoácidos de la proteína IL-15 madura exenta del péptido de señal de IL-15.

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal distinta de IL-15 unida a la proteína IL-15 codificada por SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, la molécula está exenta de la secuencia codificante para la secuencia de señal de IL-15. En algunas realizaciones preferidas, la proteína de fusión es no inmunógena en un humano.

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que incluyen un constructo de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1 y opcionalmente las otras mejoras anteriores arriba descritas pueden incluir también en la misma molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico diferente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno. Generalmente, los inmunógenos, que se exponen más adelante, pueden ser cualquier proteína inmunógena que incluya alérgenos, antígenos patógenos, antígenos asociados con cáncer o antígenos unidos a células asociadas con enfermedades autoinmunes. En realizaciones preferidas, el inmunógeno es un antígeno patógeno, muy preferiblemente un patógeno seleccionado del grupo constituido por HIV, HSV, HCV, y WNV.

En algunas realizaciones preferidas, los constructos de ácido nucleico son plásmidos. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico se incorpora en un vector viral tal como vaccinia, adenovirus, virus asociado con adenovirus, retrovirus, RSV, VSV, poxvirus o cualquier otro vector viral aceptable útil como vacuna o vector de terapia génica.

Constructos genéticos que comprenden SEQ ID NO: 1 pueden incorporarse directamente en patógenos vivos atenuados de acuerdo con algún aspecto de la invención. Ejemplos de tales patógenos útiles como vacunas se exponen más adelante. En realizaciones preferidas, la IL-15 humana, preferiblemente exenta de la secuencia de señal de IL-15, está enlazada a la secuencia de señal de IgE humana.

Composiciones que incluyen secuencias codificantes para inmunógenos son útiles como vacunas. Las composiciones que no incluyen secuencias codificantes para inmunógenos pueden ser útiles como composiciones inmunomoduladoras. En algunas realizaciones, se proporcionan también inmunógenos proteínicos como diana para la respuesta inmune que será mejorada por la expresión de IL-15.

En algunas realizaciones preferidas, los constructos de ácido nucleico son plásmidos. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico se incorpora en un vector viral tal como vaccinia, adenovirus, virus asociado con adenovirus, retrovirus, o cualquier otro vector viral aceptable útil como vacuna o vector de terapia génica.

Constructos genéticos que comprenden SEQ ID NO: 1 pueden incorporarse directamente en patógenos vivos atenuados de acuerdo con algunos aspectos de la invención. Ejemplos de tales patógenos útiles como vacunas se exponen más adelante. En realizaciones preferidas, la IL-15 humana, preferiblemente exenta de la secuencia de señal de IL-15, está enlazada a la secuencia de señal de IgE humana.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención comprenden constructos genéticos que incluyen secuencias codificantes para inmunógenos y/o proteínas inmunógenas. Tales composiciones se suministran a un individuo para modular la actividad del sistema inmunológico del individuo y mejorar de este

modo la respuesta inmune contra el inmunógeno. Cuando las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína inmunomoduladora son absorbidas por las células del individuo, las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína inmunomoduladora se expresan en las células y las proteínas se suministran de este modo al individuo. Aspectos de la invención proporcionan métodos de suministro de las secuencias codificantes de las proteínas en una molécula de ácido nucleico individual, en composiciones que comprenden diferentes moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más de los diversos factores de transcripción o factores intermedios, como parte de vacunas recombinantes y como parte de vacunas atenuadas.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos que inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente a un individuo contra un patógeno o células anormales, relacionadas con enfermedades. La vacuna puede ser cualquier tipo de vacuna tal como una vacuna viva atenuada, una vacuna de células, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o DNA.

La presente invención se refiere a composiciones para suministro de las proteínas inmunomoduladoras y métodos de utilización de las mismas.

Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse utilizando cualquiera de varias tecnologías bien conocidas que incluyen inyección de DNA (a lo que se hace referencia también como vacunación con DNA), vectores recombinantes tales como adenovirus recombinante, virus asociado con adenovirus recombinante, y vaccinia recombinante.

Vacunas de DNA se describen en las Patentes U.S. Núms. 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055, 5.676.594, y las solicitudes de prioridad citadas en esta memoria. Además de los protocolos de suministro descritos en dichas solicitudes, métodos alternativos de suministro de DNA se describen en las Patentes U.S. Núms. 4.945.050 y 5.036.066.

Las rutas de administración incluyen, pero sin carácter limitante, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraocular y oral así como las rutas tópica, transdérmica, por inhalación o supositorio o al tejido mucosal, por ejemplo por lavado hasta tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. Rutas de administración preferidas incluyen inyección en el tejido mucosal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmico y subcutáneo. Los constructos genéticos pueden administrarse por medios que incluyen, pero sin carácter limitante, jeringuillas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, o cañones génicos de bombardeo con microproyectiles".

Cuando es/son capturado(s) por una célula, el o los constructos genéticos pueden mantenerse presentes en la célula como una molécula funcional extracromosómica, y/o integrarse en el DNA cromosómico de la célula. El DNA puede introducirse en las células en las que se mantiene como material genético separado en forma de un plásmido o plásmidos. Alternativamente, el DNA lineal que puede integrarse en el cromosoma se puede introducir en la célula. Cuando se introduce DNA en la célula, pueden añadirse reactivos que promueven la integración del DNA en los cromosomas. Secuencias de DNA que son útiles para promover integración pueden incluirse también en la molécula de DNA. Alternativamente, puede administrarse RNA a la célula. Se contempla también proporcionar el constructo genético como un minicromosoma lineal que incluye un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Los constructos génicos pueden mantenerse como parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en las células. Los constructos génicos pueden formar parte de genomas de vacunas virales recombinantes en donde el material genético se integra en el cromosoma de la célula o se mantiene extracromosómico. Los constructos genéticos incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de parada, y una señal de poliadenilación. Adicionalmente, a menudo se requieren intensificadores para la expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína inmunomoduladora. Es necesario que estos elementos estén enlazados operativamente a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores sean operativos en el individuo al que se administran.

Los codones de iniciación y el codón de parada se consideran generalmente parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo al que se administra el constructo génico. Los codones de iniciación y terminación deben estar en marco con la secuencia codificante.

Los promotores y señales de poliadenilación utilizados tienen que ser funcionales dentro de las células del individuo.

Ejemplos de promotores útiles para la práctica de la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para humanos, incluyen, pero sin carácter limitante, los promotores del Virus 40 de los Simios (SV40), el promotor del Virus del Tumor Mamario del Ratón (MMTV), el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (MV) tal como el promotor de la Repetición Terminal Larga (LTR) BIV, el Virus Moloney, ALV, Citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato del CMV, el Virus Epstein Barr (EBV), el Virus del Sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana.

Ejemplos de señales de poliadenilación útiles para la práctica de la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para humanos, incluyen pero sin carácter limitante señales de poliadenilación de SV40

y señales de poliadenilación de LTR. En particular, se utiliza la señal de poliadenilación de SV40 que se encuentra en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), a la que se hace referencia como la señal de poliadenilación de SV40.

5 Además de los efectos reguladores requeridos para la expresión del DNA, pueden incluirse también otros elementos en la molécula de DNA. Tales elementos adicionales incluyen intensificadores. El intensificador puede seleccionarse del grupo que incluye, pero sin carácter limitante: Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, Creatina muscular humana e intensificadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.

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

15 En algunas realizaciones preferidas relacionadas con aplicaciones de inmunización, se suministran una o más moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una proteína diana, la proteína inmunomoduladora y, inicialmente, genes de proteínas que intensifican adicionalmente la respuesta inmune contra tales proteínas diana. Ejemplos de tales genes son los que codifican otras citoquinas y linfoquinas tales como interferón alfa, interferón gamma, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), TNF, GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15 con inclusión de IL-15 que tiene la secuencia de señal delecionada, y con inclusión, opcionalmente, de la secuencia de señal de IgE.

20 Puede añadirse un elemento adicional que sirve como diana para destrucción celular si se desea eliminar las células que reciben el constructo genético por cualquier razón. En el constructo genético puede incluirse un gen de timidinaquinasa (TK) de herpes en una forma expresable. El fármaco ganciclovir puede administrarse al individuo y dicho fármaco causará la destrucción selectiva de cualquier célula productora de tk, proporcionando así el medio para la destrucción selectiva de células con el constructo genético.

25 Con objeto de maximizar la producción de proteínas, pueden seleccionarse secuencias reguladoras que son muy adecuadas para expresión génica en las células a las que se administra el constructo. Además, pueden seleccionarse codones que se transcriben muy eficientemente en la célula. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede producir constructos de DNA que son funcionales en las células.

En algunas realizaciones, pueden proporcionarse constructos génicos a fin de producir secuencias codificantes para las proteínas inmunomoduladoras descritas en esta memoria enlazadas al péptido de señal de IgE.

30 Un método de la presente invención comprende los pasos de administrar moléculas de ácido nucleico por vía intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, o tópica o por lavado a tejido mucosal seleccionado del grupo constituido por inhalación, vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual.

35 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se suministra a las células en conjunción con la administración de un intensificador de la función de los polinucleótidos o un agente facilitador de vacunas genéticas. Intensificadores de la función de los polinucleótidos se describen en U.S. Número de Serie 5.593.972, 5.962.428 y la Solicitud Internacional Número de Serie PCT/US94/00899, presentada el 26 de enero de 1994. Agentes facilitadores de vacunas genéticas se describen en U.S. Número de Serie 021579 presentada el 1 de abril de 1994. Los coagentes que se administran en conjunción con moléculas de ácido nucleico pueden administrarse como una mixtura con la molécula de ácido nucleico o administrarse por separado simultáneamente, antes o después de la administración de las moléculas de ácido nucleico. Adicionalmente, otros agentes que pueden funcionar como agentes de transfección y/o agentes de replicación y/o agentes inflamatorios y que pueden coadministrarse con un GVF incluyen factores de crecimiento, citoquinas y linfoquinas tales como interferón α , interferón gamma, GM-CSF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), TNF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), ILA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15 así como factor de crecimiento de fibroblastos, agentes tensioactivos tales como complejos inmuno-estimuladores (ISCOMS), adyuvante de Freund incompleto, análogos de LPS que incluyen el lípido monofosforilado A (WL), muramil-péptidos, análogos de quinonas y vesículas tales como escualeno y escualano, y ácido hialurónico pueden utilizarse también administrados en conjunción con el constructo genético. En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora puede utilizarse como un GVF. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se proporciona en asociación con PLG para intensificar el suministro/la captura.

40 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 2000 microgramos de DNA. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 1000 microgramos de DNA. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 10 nanogramos a aproximadamente 800 microgramos de DNA. . En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de DNA. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de DNA. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 25 a aproximadamente 250 microgramos de DNA. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de DNA.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con el modo de administración a utilizar. En los casos en que las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, las mismas son estériles, exentas de pirógenos y exentas de partículas. Preferiblemente se utiliza una formulación isotónica. Por regla general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade a la formulación un agente de vasoconstricción.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, se proporcionan métodos de inducción de respuestas inmunes contra un inmunógeno por el suministro de las composiciones de la invención a un individuo. La vacuna puede ser una vacuna viva atenuada, una vacuna de células, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o DNA.

Además de la utilización de formas expresables de la secuencia codificante de la proteína inmunomoduladora para mejorar las vacunas genéticas, la presente invención se refiere a vacunas atenuadas vivas mejoradas y vacunas mejoradas que utilizan vectores recombinantes para suministrar genes extraños que codifican antígenos. Ejemplos de vacunas atenuadas vivas y aquéllas que utilizan vectores recombinantes para suministrar antígenos extraños se describen en las Patentes U.S. Núms.: 4,722,848; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424; 5,225,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; y 5,482,713. Se proporcionan constructos génicos que incluyen la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína inmunomoduladora que está enlazada operativamente a secuencias reguladoras que pueden funcionar en la vacuna para efectuar la expresión. Los constructos génicos se incorporan en las vacunas vivas atenuadas y vacunas recombinantes para producir vacunas mejoradas de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona un método mejorado de inmunización de individuos que comprende el paso de suministrar constructos génicos a las células de individuos como parte de composiciones de vacuna que incluyen vacunas de DNA, vacunas atenuadas vivas y vacunas recombinantes. Los constructos génicos comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína inmunomoduladora y que está enlazada operativamente a secuencias reguladoras que pueden funcionar en la vacuna para efectuar la expresión. Las vacunas mejoradas dan como resultado una respuesta inmune celular intensificada.

La presente invención es útil para provocar respuestas inmunes intensificadas contra una proteína diana, es decir proteínas asociadas específicamente con patógenos, alérgenos o las células "anormales" del propio individuo. La presente invención es útil para inmunizar individuos contra agentes patógenos y organismos de tal modo que una respuesta inmune contra una proteína patógena proporciona inmunidad protectora contra el patógeno. La presente invención es útil para combatir enfermedades y trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer por suscitar una respuesta inmune contra una proteína diana que está asociada específicamente con las células hiperproliferativas. La presente invención es útil para combatir enfermedades y trastornos autoinmunes por suscitar una respuesta inmune contra una proteína diana que está asociada específicamente con células implicadas en la afección autoinmune.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, se introduce DNA o RNA que codifica una proteína diana y proteínas inmunomoduladoras en las células o tejidos de un individuo en el que se expresa el mismo, produciendo así las proteínas codificadas. Las secuencias de DNA o RNA que codifican la proteína diana o una o ambas proteínas inmunomoduladoras están enlazadas a elementos reguladores necesarios para la expresión en las células del individuo. Elementos reguladores para la expresión de DNA incluyen un promotor y una señal de poliadenilación. Adicionalmente, otros elementos, tales como una región Kozak, pueden incluirse también en el constructo genético.

En algunas realizaciones, formas expresables de secuencias que codifican la proteína diana y formas expresables de secuencias que codifican ambas proteínas inmunomoduladoras, se encuentran en la misma molécula de ácido nucleico que se suministra al individuo.

En algunas realizaciones, formas expresables de secuencias que codifican la proteína diana se encuentran en una molécula de ácido nucleico separada de las moléculas de ácido nucleico que contienen formas expresables de secuencias que codifican una o más proteínas inmunomoduladoras. En algunas realizaciones, formas expresables de secuencias que codifican la proteína diana y formas expresables de secuencias que codifican una o más de las proteínas inmunomoduladoras se encuentran en una molécula de ácido nucleico que está separada de la molécula de ácido nucleico que contiene formas expresables de secuencias que codifican una o más de las proteínas inmunomoduladoras. Moléculas de ácido nucleico diferentes múltiples pueden producirse y suministrarse de acuerdo con la presente invención y suministrarse al individuo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, formas expresables de secuencias que codifican la proteína diana se encuentran en moléculas de ácido nucleico separadas de las moléculas de ácido nucleico que contienen formas expresables de secuencias que codifican una o más de las proteínas inmunomoduladoras que se encuentran en moléculas de ácido nucleico separadas de las moléculas de ácido nucleico que contienen formas expresables de secuencias que codifican una o más proteínas inmunomoduladoras. En tales casos, se suministra al individuo la totalidad de las tres moléculas.

La o las moléculas de ácido nucleico pueden proporcionarse como DNA plasmídico, las moléculas de ácido nucleico de vectores recombinantes o como parte del material genético proporcionado en una vacuna atenuada o vacuna de

células. Alternativamente, en algunas realizaciones, la proteína diana y/o cualquiera o ambas proteínas inmunomoduladoras pueden suministrarse como una proteína adicionalmente a las moléculas de ácido nucleico que codifican las mismas o en lugar de las moléculas de ácido nucleico que codifican las mismas.

Los constructos genéticos pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína diana o una proteína inmunomoduladora enlazada operativamente a elementos reguladores necesarios para la expresión génica. De acuerdo con la invención, se proporcionan combinaciones de constructos génicos que incluyen uno que comprende una forma expresable de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína diana y uno que incluye una forma expresable de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína inmunomoduladora. La incorporación en una célula viva de la o las moléculas de DNA o RNA que incluyen la combinación de constructos génicos da como resultado la expresión del DNA o RNA y la producción de la proteína diana y una o más proteínas inmunomoduladoras. De ello resulta una respuesta inmune intensificada contra la proteína diana.

La presente invención puede utilizarse para inmunizar un individuo contra la totalidad de patógenos tales como virus, organismos procariotas y organismos eucariotas patógenos tales como organismos patógenos unicelulares y parásitos multicelulares. La presente invención es particularmente útil para inmunizar un individuo contra aquellos patógenos que infectan las células y que no están encapsulados tales como virus, y procariotas tales como gonorrea, listeria y shigella. Adicionalmente, la presente invención es útil también para inmunizar un individuo contra patógenos protozoarios que incluyen una etapa en el ciclo vital en la cual los mismos son patógenos intracelulares. La Tabla 1 proporciona un listado de algunas de las familias y géneros de virus para los cuales pueden producirse vacunas de acuerdo con la presente invención. Los constructos de DNA que comprenden secuencias de DNA que codifican los péptidos que comprenden al menos un epítipo idéntico o sustancialmente similar a un epítipo presentado sobre un antígeno patógeno tales como los antígenos listados en las tablas, son útiles en vacunas. Además, la presente invención es útil también para inmunizar un individuo contra otros patógenos que incluyen patógenos protozoarios procariotas y eucariotas así como parásitos multicelulares tales como los enumerados en la Tabla 2.

Con objeto de producir una vacuna genética para conferir protección contra la infección por patógenos, material genético que codifica proteínas inmunógenas contra las cuales puede montarse una respuesta inmune protectora, tiene que incluirse en un constructo genético como la secuencia codificante de la diana. Tanto si el patógeno infecta por vía intracelular, para lo cual es particularmente útil la presente invención, como si lo hace extracelularmente, es improbable que todos los antígenos patógenos susciten una respuesta protectora. Dado que DNA y RNA son ambos relativamente pequeños y pueden producirse con relativa facilidad, la presente invención proporciona la ventaja adicional de permitir la vacunación con antígenos patógenos múltiples. El constructo genético utilizado en la vacuna genética puede incluir material genético que codifica muchos antígenos patógenos. Por ejemplo, pueden incluirse varios genes virales en un solo constructo proporcionando con ello dianas múltiples.

Las Tablas 1 y 2 incluyen listas de algunos de los agentes y organismos patógenos para los cuales pueden prepararse vacunas genéticas a fin de proteger un individuo contra la infección por los mismos. En algunas realizaciones preferidas, los métodos de inmunización de un individuo contra un patógeno están dirigidos contra HIV, HSV, HCV, WNV o HBV.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de conferir una respuesta inmune protectora contra células hiperproliferantes que son características en enfermedades hiperproliferativas y un método de tratamiento de individuos que sufren enfermedades hiperproliferativas. Ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen todas las formas de cáncer y psoriasis.

Se ha descubierto que la introducción de un constructo genético que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína inmunógena asociada a "células hiperproliferantes" en las células de un individuo da como resultado la producción de dichas proteínas en las células vacunadas de un individuo. Para inmunizar contra enfermedades hiperproliferativas, se administra a un individuo un constructo genético que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que está asociada con una enfermedad hiperproliferativa.

Para que la proteína hiperproliferativa-asociada sea una diana inmunógena eficaz, la misma tiene que ser una proteína que sea producida exclusivamente o a niveles más altos en células hiperproliferativas en comparación con las células normales. Antígenos diana incluyen tales proteínas, fragmentos de las mismas y péptidos, que comprenden al menos un epítipo encontrado en tales proteínas. En algunos casos, una proteína hiperproliferativa-asociada es el producto de una mutación de un gen que codifica una proteína. El gen mutado codifica una proteína que es prácticamente idéntica a la proteína normal, excepto que tiene una secuencia de aminoácidos ligeramente diferente que da como resultado un epítipo diferente no encontrado en la proteína normal. Tales proteínas diana incluyen aquellas que son proteínas codificadas por oncogenes tales como *myb*, *myc*, *fyn*, y el gen de translocación *bcr/abl*, *ras*, *src*, *P53*, *neu*, *trk* y EGRF. Además de productos oncogénicos como antígenos diana, las proteínas diana para tratamientos anti-cáncer y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos constituidos por linfomas de células B y regiones variables de receptores de células T de linfomas de células T que, en algunas realizaciones, son antígenos diana utilizados también para enfermedades autoinmunes. Otras proteínas asociadas a tumores pueden utilizarse como proteínas diana, tales como proteínas que se encuentran a niveles más altos en células tumorales, con inclusión de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 17-1A, y proteínas de fijación de folato o PSA.

Si bien la presente invención puede utilizarse para inmunizar un individuo contra una o más de varias formas de cáncer, la presente invención es particularmente útil para inmunizar profilácticamente un individuo que está predispuesto a desarrollar un cáncer particular o que ha padecido cáncer y es por tanto susceptible de sufrir una recidiva. Los desarrollos en la genética y la tecnología así como la epidemiología permiten la determinación de la evaluación de probabilidad y riesgo de desarrollo de cáncer en un individuo. Por utilización de cribado genético y/o historias de salud familiar, es posible predecir la probabilidad que tiene un individuo particular de desarrollar uno cualquiera de varios tipos de cáncer.

Análogamente, aquellos individuos que han desarrollado ya un cáncer y que han sido tratados para eliminar el cáncer o se encuentran en cualquier otro caso en remisión son particularmente propensos a recidiva y reaparición. Como parte de un régimen de tratamiento, tales individuos pueden inmunizarse contra el cáncer que les ha sido diagnosticado, a fin de combatir una recurrencia. Así, una vez que se sabe que un individuo ha sufrido un tipo de cáncer y se encuentra en riesgo de sufrir una recidiva, el mismo puede inmunizarse a fin de preparar su sistema inmunológico para combatir cualquier aparición futura del cáncer.

La presente invención proporciona un método de tratamiento de individuos que sufren enfermedades hiperproliferativas. En tales métodos, la introducción de constructos genéticos sirve como inmunoterapéutico, dirigiendo y promoviendo el sistema inmunológico del individuo para combatir las células hiperproliferativas que producen la proteína diana.

La presente invención proporciona un método de tratamiento de individuos que sufren enfermedades y trastornos autoinmunes por conferir una respuesta inmune protectora de base amplia contra las dianas que están asociadas con la autoinmunidad, con inclusión de receptores celulares y células que producen anticuerpos dirigidos contra uno mismo.

Enfermedades autoinmunes mediadas por las células T incluyen artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), síndrome de Sjögren, sarcoidosis, diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), tiroiditis autoinmune, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por receptores de células T que se fijan a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con las enfermedades autoinmunes. La vacunación contra la región variable de las células T podría suscitar una respuesta inmune que incluyera CTLs para eliminar dichas células T.

En la RA, han sido caracterizadas varias regiones variables específicas de receptores de células T (TCRs) que están implicadas en la enfermedad. Estas TCRs incluyen $V\beta$ -3, $V\beta$ -14, $20V\beta$ -17 y $V\alpha$ -17. Así, la vacunación con un constructo de DNA que codifica al menos una de estas proteínas suscitará una respuesta inmune que direccionará las células T implicadas en la RA. Véase Howell, M.D., et al., 1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:10921-10925; Piliard, X., et al, 1991 Science 253:325-329; Williams, W.V., et al., 1992 J Clin. Invest. 90:326-333. En la MS, han sido caracterizadas varias regiones variables específicas de TCRs que están implicadas en la enfermedad. Estas TCRs incluyen $V\beta$ y $V\alpha$ -10. Así, la vacunación con un constructo de DNA que codifica al menos una de estas proteínas suscitará una respuesta inmune que direccionará las células T implicadas en la MS. Véase: Wucherpfennig, K.W., et al., 1990 Science 248:1016-1019; Oksenberg, J.R., et al, 1990 Nature 345:344-346.

En el escleroderma, han sido caracterizadas varias regiones variables específicas de TCRs que están implicadas en la enfermedad. Estas TCRs incluyen $V\beta$ -6, $V\beta$ -8, $V\beta$ -14 y $V\alpha$ -16, $V\alpha$ -3C, $V\alpha$ -7, $V\alpha$ -14, $V\alpha$ -15, $V\alpha$ -16, $V\alpha$ -28 y $V\alpha$ -12. Así, la vacunación con un constructo de DNA que codifica al menos una de estas proteínas suscitará una respuesta inmune que direccionará las células T implicadas en el escleroderma.

A fin de tratar pacientes que sufren una enfermedad autoinmune mediada por las células T, particularmente aquellas para las cuales la región variable de la TCR no ha sido caracterizada todavía, puede realizarse una biopsia sinovial. Pueden tomarse muestras de las células T presentes e identificarse la región variable de dichas TCRs utilizando técnicas estándar. Utilizando esta información se pueden preparar vacunas genéticas.

Enfermedades autoinmunes mediadas por células B incluyen Lupus (SLE), enfermedad de Grave, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, asma, crioglobulinemia, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por anticuerpos que se fijan a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con las enfermedades autoinmunes. La vacunación contra la región variable de los anticuerpos podría suscitar una respuesta inmune que incluyera CTLs para eliminar dichas células B que producen el anticuerpo.

Para tratar pacientes que sufren una enfermedad autoinmune medida por células B, tiene que identificarse la región variable de los anticuerpos implicados en la actividad autoinmune. Puede realizarse una biopsia y pueden tomarse muestras de los anticuerpos presentes en un sitio de inflamación. La región variable de dichos anticuerpos puede identificarse utilizando técnicas estándar. Utilizando esta información pueden prepararse vacunas genéticas.

En el caso de la SLE, se cree que un antígeno es DNA. Así, en pacientes que deban inmunizarse contra la SLE, pueden cribarse sus sueros respecto a anticuerpos anti-DNA y puede prepararse una vacuna que incluye constructos de DNA que codifican la región variable de dichos anticuerpos anti-DNA encontrados en los sueros.

5 Las características estructurales comunes entre las regiones variables tanto de TCRs como de los anticuerpos son bien conocidas. La secuencia de DNA que codifica una TCR o anticuerpo particular puede encontrarse generalmente siguiendo métodos bien conocidos tales como los descritos en Kabat, et al. 1987, Sequence of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Humana Services, Bethesda MD. Adicionalmente, un método general para clonación de genes variables funcionales de anticuerpos puede encontrarse en Chaudhary, V.K., et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066.

10

Tabla 1

Familia Picornavirus

Géneros: Rinovirus: (Medicinales) responsables de - 50% casos del resfriado común.
Enterovirus: (Medicinales) incluye poliovirus, coxsackievirus, ecovirus, y enterovirus humanos tales como el virus de la hepatitis A. Aptovirus: (Veterinarios) éstos son los virus de la fiebre aftosa.

Antígenos diana: VP1, VP2, VP3, VP4, VP5

Familia Calcivirus

Géneros: Grupo de Virus Norwalk: (Medicinales) estos virus son un agente causante importante de la gastroenteritis epidémica.

Familia Togavirus

Géneros: Alfavirus: (Medicinales y Veterinarios) ejemplos incluyen:
Virus Senilis, virus RossRiver y encefalitis equina Oriental y Occidental
Reovirus: (Medicinales) virus de la rubéola.

Familia Flaviviridae

Ejemplos incluyen: (Medicinales) dengue, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis de San Luis y virus de la encefalitis transportada por ácaros. Virus del Nilo Occidental (GenBank NC001563, AF533540, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, M12294, AF317203, AF196835, AF260969, AF260968, AF260967, AF206518 y AF202541)

Antígenos Diana Representativos

E
NS5
C

Virus de la Hepatitis C: (Medicinales) estos virus no se han incluido todavía en una familia, pero se cree que son un togavirus o un flavivirus. Su máxima semejanza es con la familia togavirus.

ES 2 374 458 T3

(continuación)

Familia Coronavirus: (Medicinales y Veterinarios)

Virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral)
Virus de la gastroenteritis transmisible de los porcinos (cerdo)
Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante de los porcinos (cerdo)
Virus de la peritonitis infecciosa de los felinos (gatos)

Coronavirus entérico de los felinos (gato)

Coronavirus de los cánidos (perro)

Coronavirus asociado a SARS

Los coronavirus respiratorios humanos causan -40 casos del resfriado común. EX.224E, OC43

Nota – los coronavirus pueden causar hepatitis no-A, B o C

Antígenos diana:

E1 – denominado también proteína M o matriz

E2 – denominado también proteína S o Spike

E3 – denominando también BE o glicoproteína

hemaglutina-elterosa (no presente en todos los coronavirus)

N - nucleocápsida

Familia rhabdovirus

Géneros: Vesiliovirus

Lyssavirus: (Medicinales y Veterinarios) rabia

Antígeno diana: Proteína G

Proteína N

Familia Filoviridae: (Medicinales)

Virus de la fiebre hemorrágica tales como los virus Marburg y Ebola

Familia Paramixovirus:

Géneros: Paramixovirus: (Medicinales y Veterinarios)

Virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle (patógeno importante en los pollos)

Morbilivirus: (Medicinales y Veterinarios)

Sarampión, moquillo de los cánidos

Pneumovirus: (Medicinales y Veterinarios)

Virus respiratorio sincitial

Familia Ortomixovirus (Medicinales)

El virus de la gripe

Familia Bunyavirus

Géneros: Bunyavirus: (Medicinales): encefalitis de California, La Crosse

Flebovirus: (Medicinales): fiebre del Valle de Rift

Hantavirus Puremala es un virus de la fiebre hemorrágica

Nairivirus: (Veterinarios) enfermedad de las ovejas de Nairobi

Además: muchos bunyavirus no asignados

Familia Arenavirus (Medicinales)

LCM, Virus de la fiebre de Lassi

Familia Reovirus

Géneros: Reovirus: un posible patógeno humano

(continuación)

Familia Coronavirus: (Medicinales y Veterinarios)

Rotavirus: gastroenteritis aguda en los niños
Orbivirus: (Medicinales y Veterinarios), fiebre del ácaro de Colorado, Lebombo (humanos), encefalosis de los equinos, lengua azul

Familia Retrovirus

Sub-familia:

Oncorivirinal: (Veterinarios) (Medicinales): virus de la leucemia de los felinos, HTLVI y HTLVII Lentivirinae: (Medicinales y Veterinarios) HIV, virus de la inmunodeficiencia de los felinos, infecciones de los equinos, virus de la anemia Spumavirinae

Familia Papovavirus

Sub-familia:

Poliomavirus: (Medicinales), virus BKU y JCU

Sub-familia

Papilomavirus: (Medicinales) muchos tipos de virus asociados con cánceres o progresión maligna del papiloma.

Adenovirus (Medicinales)

EX AD7, ARD., O.B. – causan enfermedad respiratoria – algunos adenovirus tales como el 275 causan enteritis

Familia Parvovirus (Veterinarios)

Parvovirus de los felinos:
Felinos
Parvovirus de los cánidos
Parvovirus de los porcinos

Causa enteritis de los felinos
Panleucopeniavirus

Familia Herpesvirus

Sub-familia:

Alfaherpesviridae
Simplexvirus (Medicinales)
HSVI (GenBank X14112, NC001806), HSVII (NC001798)
Varicellovirus: (Medicinales y Veterinarios) Zoster de la pseudorrabia-varicela

Géneros:

Sub-familia:

Betaherpesviridae
Citomegalovirus (Medicinales)
HCMV

Géneros:

Sub-familia:

Muromegalovirus
Gammaherpesviridae
Linfocriptovirus (Medicinales)

Géneros:

(continuación)

Familia Coronavirus: (Medicinales y Veterinarios)		EBV – (Burkitts linfo) Rhadinovirus
	Familia Poxvirus	
	Sub-familia:	Chordopoxviridae (Medicinales- Veterinarios)
	Géneros	Variola (Viruela) Vaccinia (Viruela vacuna) Parapoxvirus - Veterinarios Avipoxvirus – Veterinarios Capripoxvirus Leporipoxvirus Suipoxvirus
Familia Hepadnavirus	Sub-familia:	Enteropoxviridae
Sin clasificar		Virus de la hepatitis B Virus de la hepatitis delta

Tabla 2

Patógenos bacterianos

Cocos patógenos gram-positivos incluyen: neumococos; estafilococos, y estreptococos. Cocos patógenos gram-negativos incluyen: meningococos, y gonococos.

Bacilos patógenos gram-negativos entéricos incluyen: enterobacteriáceas, pseudomonas, acinetobacterias y eikenella, melioidosis; salmonella; shigellosis; hemophilus; chancroide; brucelosis; tularemia; yersinia (pasteurella); streptobacillus mortiliformis y spirillum; listeria monocitogenes; erisipelothrix rhusiopathiae; difteria, cólera, ántrax; donovanosis (granuloma inguinal); y bartonellosis.

Bacterias patógenas anaerobias incluyen: tétanos; botulismo; otros clostridios; tuberculosis; lepra; y otras micobacterias. Enfermedades patógenas causadas por espiroquetas incluyen: sífilis; treponematosis: yaws, pinta y sífilis endémica; y leptospirosis.

Otras infecciones causadas por bacterias patógenas superiores y hongos patógenos incluyen:

actinomicosis; nocardiosis; criptococosis, blastomicosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis; candidiasis, aspergillosis y mucomicosis; esporotricosis; paracoccidiomicosis, petriellidiosis, torulopsosis, micetoma, y cromomicosis; y dermatofitosis.

Infecciones por rickettsias incluyen rickettsiales y rickettsiasis.

Ejemplos de infecciones de micoplasmas y clamidias incluyen: micoplasma pneumoniae; linfogranuloma venereum; psittacosis; e infecciones perinatales de clamidia.

Eucariotas patógenos

Protozoos y helmintos patógenos e infecciones causadas por ellos incluyen: abediasis; malaria, leishmaniasis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; pneumocystis carinii; babesiosis; giardiasis; triquinosis; filariasis; esquistosomiasis; nematodos; trematodos o flukes; e infecciones causadas por cestodos (solitaria)

REIVINDICACIONES

- 1.- Una molécula de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1.
- 2.- La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 exenta de una o más secuencias seleccionadas del grupo constituido por:
- 5 1) secuencia codificante para una secuencia de señal de IL-15;
 2) región Kozak de IL-15;
 3) región 5' no traducida de IL-15;
 4) región 3' no traducida de IL-15; y
- que comprende opcionalmente una secuencia codificante para una secuencia de señal no perteneciente a IL-15.
- 10 3.- La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo constituido por:
- 1) una secuencia codificante para una secuencia de señal de IgE; y
 2) una secuencia codificante para un inmunógeno.
- 15 4.- La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-3, que comprende una secuencia codificante para un inmunógeno, en donde el inmunógeno se selecciona del grupo constituido por:
- 1) un antígeno patógeno;
 2) un antígeno asociado con cáncer; y
 3) un antígeno ligado a células asociadas con enfermedades autoinmunes.
- 20 5.- La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, en donde el inmunógeno es un antígeno patógeno, en donde el patógeno se selecciona del grupo constituido por HIV, HSV, HCV, y WNV.
- 6.- La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5, en donde la molécula de ácido nucleico se incorpora en uno de:
- 25 1) un plásmido;
 2) un vector viral; o
 3) un patógeno vivo atenuado.
- 7.- Una vacuna recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno.
- 8.- La vacuna recombinante de la reivindicación 7, en donde dicha vacuna recombinante en un virus Vaccinia recombinante.
- 30 9.- Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5 y una molécula de ácido nucleico que codifica un inmunógeno.
- 10.- La composición de la reivindicación 9 en donde dichas moléculas de ácido nucleico son plásmidos.
- 11.- Una composición farmacéutica inyectable que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5 y opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno.
- 35 12.- La composición farmacéutica inyectable de la reivindicación 11, en la cual la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 5 se incorpora en uno de:
- 1) un plásmido;
 2) un vector viral; o
 3) un patógeno vivo atenuado.
- 40 13.- La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5 para uso en la modulación de una respuesta inmune en un individuo.
- 14.- La composición de las reivindicaciones 9 ó 10 para uso en la inducción de una respuesta inmune en un individuo contra un inmunógeno.

FIGURA 1

1

SEQ ID NO:1

GAATTCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGCTACAAGAGTG
CACAGCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGC
ATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGATGTGCACCCAGCTGTAAGGTGACC
GCCATGAAGTGCTTCTGCTGGAGCTGCAGGTGATCAGCCTGGAGAGCGGCGACGCCAGC
ATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGC
AATGTGACCGAGAGCGGCTGTAAGGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAGGAG
TTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGATGACTCGAG