

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 731**

51 Int. Cl.:
C12N 15/863 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06703897 .6**
96 Fecha de presentación: **24.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1851320**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Vacunas basadas en el uso de VMA**

30 Prioridad:
24.01.2005 EP 05001362

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2012

73 Titular/es:
**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT (GMBH)
INGOLSTÄDTER LANDSTRASSE 1
85764 NEUHERBERG, DE**

72 Inventor/es:
**DREXLER, Ingo;
SUTTER, Gerd;
GASTEIGER, Georg y
ERFLE, Volker**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 380 731 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 basadas en el uso de VMA

La presente invención está en el campo de vacunas basadas en el virus vacuna modificado de Ankara recombinante (MV).

5 El virus vacuna (VV) pertenece al género Orthopoxvirus de la familia poxvirus. Ciertas cepas del virus vacuna se han usado durante muchos años como una vacuna viva para inmunizar contra la viruela, por ejemplo la cepa Elstree del Instituto Lister en el Reino Unido. Debido a las complicaciones que pueden derivar de la vacunación (Schär, Zeitschr. für Präventivmedizin 18, 41-44 [1973]), y debido a la declaración en 1980 de la OMS de que la viruela se había erradicado, actualmente sólo se vacuna contra la viruela a personas en alto riesgo.

10 Los virus vacunas también se han usado como vectores para la producción y entrega de antígenos extraños (Smith y col., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 2, 383-407 [1984]). Esto implica secuencias de ADN (genes) que codifican los antígenos extraños que se están introduciendo, con la ayuda de técnicas de recombinación de ADN, en el genoma de los virus vacunas. Si el gen se integra en un lugar en el ADN vírico que no es esencial para la vida del ciclo, es posible que el virus vacuna recombinante recién producido sea infeccioso, es decir, que sea capaz de infectar células extrañas y de este modo expresar la secuencia integrada de ADN (Solicitudes de Patentes EP N° 83.286 y N° 110.385). Los virus vacunas recombinantes preparados de esta manera pueden usarse, por un lado, como vacunas vivas para la profilaxis de infecciones, y por otro lado, para la preparación de proteínas heterólogas en células eucariotas.

20 El virus vacuna está entre los vectores vivos más exhaustivamente evaluados y tiene características particulares en apoyo de su uso como vacuna recombinantes: es altamente estable, barato de fabricar, fácil de administrar, y puede alojar grandes cantidades de ADN externo. Tiene la ventaja de inducir tanto respuestas de anticuerpos como respuestas citotóxicas, y permite la presentación de antígenos al sistema inmune de una manera más natural, y se usó con éxito como vacuna de vector que protege contra enfermedades infecciosas en una amplia variedad de modelos de animales. Además, los vectores vacuna son herramientas de investigación extremadamente valiosas para analizar la relación estructura-función de las proteínas recombinantes, determinar dianas de respuestas inmunes tumorales y mediadas por las células, e investigar el tipo de defensa inmune necesaria para proteger contra una enfermedad específica.

30 Sin embargo, el virus vacuna es infeccioso para seres humanos y su uso como vector de expresión en el laboratorio ha estado muy afectado por motivos de seguridad y regulaciones. Además, la réplica productiva del vector vacuna recombinantes dificulta las posibles futuras aplicaciones de virus vacuna recombinante, por ejemplo, para generar proteínas recombinantes o partículas víricas recombinantes para nuevas técnicas terapéuticas o profilácticas en humanos. La mayoría de los virus vacunas recombinantes descritos en la bibliografía se basan en la cepa Western Reserve (WR) del virus vacuna. Por otro lado, se conoce que esta cepa es altamente neurovirulenta y de este modo no es nada adecuada para su uso en humanos y animales (Morita y col., Vaccine 5, 65-70 [1987]).

35 Las preocupaciones relativas a la seguridad de las cepas convencionales de VV han sido tratadas por el desarrollo de los vectores vacuna de cepas de virus altamente atenuados que se caracterizan por su capacidad replicativa restringida *in vitro* y su avirulencia *in vivo*. Las cepas de los virus especialmente cultivadas para evitar efectos secundarios no deseados se han conocido durante mucho tiempo. De este modo, ha sido posible, mediante pasos en serie a largo plazo de la cepa Ankara del virus vacuna (CVA) en fibroblastos de embriones de pollo, cultivar VMA (para revisión véase Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. y Stickl, H. (1975) Infection 3, 6-14; Patente Suiza N° 568 392). El virus VMA se depositó en cumplimiento con los requisitos del Tratado de Budapest en CNCM (Institut Pasteur, Collectionne Nationale de Cultures de Microorganismes, 25, rue de Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) el 15 de diciembre de 1987 bajo el número de depósito I-721.

45 El virus VMA se ha analizado para determinar las alteraciones en el genoma relativo a la cepa CVA de tipo salvaje. Se han identificado seis deleciones principales (deleción I, II, III, IV, V y VI) (Meyer, H., Sutter, G. y Mayr A. (1991) J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). Este virus vacuna modificado de Ankara tiene solamente una baja virulencia, es decir, no le siguen efectos secundarios cuando se usa para vacunación. Por lo tanto, es particularmente adecuado para la vacunación inicial de sujetos inmunocomprometidos. Las excelentes propiedades de la cepa VMA se han demostrado en un número de ensayos clínicos (Mayr y col., Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B 167, 375-390 [1987], stickl y col., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 [1974]).

55 El virus vacuna modificado de Ankara (VMA) es una herramienta valiosa como vector vírico seguro para la expresión de genes recombinantes y puede usarse para diferentes fines tales como el estudio *in vitro* de funciones proteicas o la inducción *in vivo* de respuestas inmunes celulares específicas del antígeno o humorales. Una principal ventaja de VMA es que permite un alto nivel de expresión genética a pesar de carecer de réplica en células humanas y en la mayoría de las células de mamíferos. El VMA como vacuna tiene un excelente historial de seguridad, puede manipularse bajo condiciones de nivel 1 de bioseguridad y ha demostrado ser inmunogénico y protector cuando entrega antígenos heterólogos en animales (1-8), y las primeras vacunas humanas candidatas han avanzado hasta ensayos clínicos.

Aunque es incapaz de multiplicarse en la mayoría de las líneas celulares de seres humanos, el VMA mantiene intacta la expresión de los genes víricos y heterólogos (Sutter y Moss, 1992). La ausencia de patogenicidad para humanos, la inherente avirulencia incluso en huéspedes inmunocomprometidos, la expresión de alto nivel de antígenos extraños y el factor adyuvante para respuestas inmunes hacen de VMA recombinante (VMAR) un vector ideal tanto para la vacunación profiláctica como la terapéutica, como lo demuestra el amplio uso en estrategias de sensibilización y refuerzo (Meseda y col., 2002, Amara y col., 2002) y en ensayos clínicos en curso (McConkey y col., 2003; Cosma y col., 2003; Hanke y col., 2002).

De hecho, las vacunas basadas en VMA recombinante (VMAR) provocan respuestas inmunes tanto humorales como adaptivas mediadas por células (Ramirez y col., 2000) y han demostrado ser protectoras en modelos de animales de varias enfermedades infecciosas (Hanke y col., 1999; Barouch y col., 2001; Weidinger y col., 2001; Schneider y col., 1998; Sutter y col., 1994b; Hirsch y col., 1996; Wyatt y col., 1996) e incluso en algunos modelos de tumor (Carroll y col., 1997; Rosales y col., 2000; Drexler y col., 1999).

Los procedimientos convencionales para generar VVr se han descrito con detalles (Earl y col., 1998) y se basan en recombinación homóloga *in vivo* entre ADN de VV del aceptor y el plásmido de transferencia transfectada, en el que el gen externo está flanqueado por secuencias de VV. Las técnicas adicionales para la generación de VMA recombinantes son, por ejemplo, las desveladas en los documentos WO 04074493, WO 03023040 y WO 9702355.

WANG y col., Blood, Agosto 2004, Vol. 104, N° 3 desvela técnicas inmunoterapéuticas para limitar la morbilidad y mortalidad del citomegalovirus (CMV) después de trasplantes de célula madre hematopoyética. Una técnica comprende el intento de insertar antígenos CMV modificados con ubiquitina en la cepa virulenta Western Reserve del virus vacuna (VV) y la cepa altamente atenuada, virus vacuna modificado de Ankara (VMA). Los antígenos CMV modificados con ubiquitina fueron antígenos inmunodominantes de fosforoproteínas 65 (pp65), fosforoproteína 150 (pp150) y proteína 1 temprana inmediata (IE1).

Sin embargo, WANG y col., mostraron que la ubiquitinización no tuvo ningún impacto o muy poco impacto sobre la inmunidad primaria para los antígenos CMV que VMAR transportaba.

Aunque el virus vacuna modificado de Ankara es considerado un vector vírico valioso y seguro para la expresión de genes recombinantes, está ampliamente aceptado que existen límites superiores para la administración de VMA a mamíferos, en particular seres humanos. Por ejemplo, la administración de VMA recombinantes a humanos actualmente está limitada a 5×10^8 UI (unidades infecciosas) por administración. Esto, sin embargo, puede ser desventajoso en el sentido de que la respuesta inmune generada por VMAR en este caso podría ser insuficiente con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado. De este modo, la reducción del número unidades infecciosas necesarias para conseguir una cierta respuesta inmune en un mamífero sería muy deseable.

Por lo tanto, un objeto subyacente de la presente invención es proporcionar un sistema de vacunación basado en VMA, que consiga respuestas inmunes suficientemente altas en mamíferos, en particular seres humanos, con un número comparablemente bajo o reducido de unidades infecciosas. Es un problema adicional que subyace la presente invención proporcionar un agente de refuerzo para los protocolos de vacunación basados en VMA, lo que lleva a una respuesta inmune secundaria mejorada contra un antígeno que se elija. La estimulación y el refuerzo con VMA que codifica un antígeno por sí mismos ya son conocidos en la técnica. Véase vaccine vol. 16, 1998, 439-445.

Estos problemas se resuelven con el contenido de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferentes se exponen en las reivindicaciones dependientes.

En resumen, la presente invención provoca las siguientes ventajas y resultados:

Inesperadamente resultó que una combinación de diferentes tipos de partículas de VMA recombinante en un protocolo de vacunación, es decir, protocolos de vacunación de sensibilización y refuerzo, mostraron respuestas inmunes celulares mejoradas en comparación con los enfoques de la técnica anterior. En otras palabras, resultó que una combinación de proteína extraña para estimular y VMA recombinantes que producía proteína extraña ubiquitinada llevó a respuestas inmunes mejoradas y necesitó menos unidades infecciosas de VMAR para administrarse a los mamíferos con el fin de conseguir una suficiente respuesta inmune. Estos resultados fueron sorprendentes ya que otros científicos, por ejemplo WANG y col., en la publicación anteriormente mencionada en Blood, Volumen 104, N° 3, indicaron que la ubiquitinación del antígeno no tenía ningún impacto sobre la inmunogenicidad de VMAR.

En la presente invención, se confirmó que las respuestas inmunes primarias de VMAR que transportaban proteínas extrañas ubiquitinadas fueron comparablemente bajas, aunque se podían mostrar grandes respuestas inmunes cuando dicho VMAR se usó como un agente de refuerzo. Los inventores descubrieron que usando el sistema de vacunación de la presente invención, la cantidad total de unidades infecciosas de VMAR usadas en la vacunación pueden reducirse de manera espectacular.

Al principio, los inventores construyeron un gen de fusión ubiquitina/tirosinasa (Ub-Tir) por medio de hibridación-PCR (Figura 1b). Después, a través de recombinación homóloga y posterior selección de célula huésped, los virus VMA recombinantes podían generarse satisfactoriamente, en los que el gen de fusión estuvo establemente

integrado en el genoma vírico y se produjo Ub-Tir como proteína de fusión ubiquitinada (Figura 1a). *In vitro*, la ubiquitinación llevó a la inestabilidad citoplasmática de las proteínas dianas por una degradación rápida y casi completa dependiente de proteasoma, llevando a una significativa semivida reducida de la proteína de fusión ubiquitinada (Figura 2). Como se ha mencionado anteriormente, al examinar la inmunogenicidad *in vivo*, sorprendentemente resultó que la vacuna VMA que contenía el antígeno ubiquitinado mostró una débil respuesta primaria en comparación con la VMA que no contenía antígeno ubiquitinado, aunque significativamente mostró respuestas inmunes secundarias mejoradas (véase Figuras 4 y 5).

En esta solicitud se reivindica un nuevo enfoque para optimizar la generación de CTL usando vectores VMA produciendo antígenos diseñados para la rápida degradación proteasomal para mejorar el procesamiento peptídico para la presentación específica de MHC clase I. Las vacunas VMA que expresan una fusión ubiquitina/proteína extraña se construyeron y caracterizaron *in vitro* por ensayo de transferencia Western, Radio-Inmunoprecipitación y Ensayo de Liberación de Cromo.

In vivo, los estudios de vacunación se realizaron en ratones transgénicos HLA-A*0201 y las respuestas CTL se analizaron mediante síntesis de citoquina intracelular y ensayos de enlace de tetrámero. *In vitro*, la tirosinasa ubiquitinada producida por VMA (Ub-Tir) se sometió a una degradación rápida que fue específicamente inhibida en presencia de inhibidores de proteasoma. Además, la ubiquitinación dio como resultado un reconocimiento significativamente mejorado de CTL específico de proteína extraña de células dianas infectadas que indicaban un mayor procesamiento peptídico y una disponibilidad de densidades mayores de péptido clase I MHC sobre la superficie celular incluso en puntos temporales tempranos de la infección vírica. En los estudios de vacunación de sensibilización y refuerzo, la proteína extraña VMA-Ub fue capaz de mejorar eficientemente las respuestas de recuerdo CTL específicas de Tir, de manera importante con dosis bajas de la vacuna.

Los datos presentados en el presente documento muestran que las vacunas VMA que entregan distintas formulaciones de antígeno podrían usarse selectivamente para estimular o reforzar lo que es muy importante para el desarrollo de protocolos de vacunación optimizados basados en VMA con inmunogenicidad mejorada.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención es un medicamento que incluye un equipo de partes que comprenden los siguientes componentes:

a) un primer componente que comprende una o más proteínas extrañas o un ácido nucleico que codifica las mismas o partes funcionales de las mismas, cuyas partes funcionales contienen una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje; y

b) un segundo componente que comprende un Virus Vacuna Modificado de Ankara (VMA), que transporta una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende:

- ubiquitina o una parte funcional de la misma, cuya parte funcional contiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje; y

- una o más proteínas extrañas, es decir, una o más proteínas que no están presentes de modo natural como una parte de VMA o partes funcionales de las mismas, cuya parte funcional comprende una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje;

en el que la una o más proteínas extrañas son las mismas en a) y b), y en el que los primeros y segundos componentes comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se señala que la proteína extraña empleada en los dos componentes es la misma.

El término "proteína extraña" como se usa en el presente documento también abarca la alternativa de cambiar no solamente una, sino también dos o más proteínas extrañas distintas en una partícula de VMA recombinante. De este modo, la inmunogenicidad contra varias enfermedades puede conseguirse mediante solamente una vacunación. El uso de dos o más proteínas extrañas puede ayudar también a evitar o vencer los mecanismos de escape de ciertas enfermedades víricas y tumorales.

Además, el término "proteína extraña" está dirigido a una proteína que no está presente de modo natural como una parte de VMA, es decir, una proteína heteróloga (y el ácido nucleico que codifica la misma).

La ubiquitina es una proteína pequeña y citosólica, que está muy conservada. Juega un papel básico en el organismo en la regulación en la degradación controlada de proteínas en las células.

La cadena de polipéptidos de ubiquitina consiste en 76 aminoácidos. Sin embargo, el término "ubiquitina" como se usa en la presente invención no está restringido a esta proteína precisa. Este término también comprende e incluye proteínas de la superfamilia de proteínas llamada "proteínas del tipo ubiquitina", es decir, proteínas que están

mostrando un motivo de pliegue del tipo ubiquitina, así como fragmentos y proteínas de fusión de las mismas. De este modo, la invención también comprende una proteína de ubiquitina seleccionada de proteínas de la superfamilia de proteínas de las proteínas del tipo ubiquitina, cuyas proteínas se modificaron mediante sustitución, inserción, delección, modificación química y similares, aunque conservan su motivo de pliegue específico o dan como resultado la introducción de la proteína de interés en la maquinaria de degradación celular.

Los ejemplos de más proteínas que se usarán en este aspecto son modificador pequeño del tipo Ub (SUMO; véase Yun-Cai Liu, Annu. Rev. Immunol. 2004. 22:81-127), secuencias PEST (Duane A. Sewell y col., CANCER RESEARCH 64, 8821-8825, 15 de diciembre, 2004). Para más información véase también Chien-Fu Hung y col., CANCER RESEARCH 63, 2393-2398, 15 de mayo, 2003).

Como se ha explicado anteriormente, el término "parte funcional" como se usa en el presente documento significa tales proteínas o el ácido nucleico que codifica las mismas, que contienen una o más sustituciones, inserciones y/o delecciones cuando se compara con la proteína/ácido nucleico de tipo salvaje sin alterar su función. Estas carecen preferentemente de uno, pero también de 2, 3, 4 o más nucleótidos 5' o 3' o dentro de la secuencia de ácido nucleico, o estos nucleótidos se sustituyen por otros. La "parte funcional" de una proteína extraña puede ser también una proteína truncada siempre y cuando cumpla su función fisiológica, es decir, proporcionar una inmunogenicidad que sea efectiva en el tratamiento y/o protección de una enfermedad específica. De este modo, la proteína extraña como la usada en la presente invención podría también referirse como un "antígeno" en el significado que es común en el campo pertinente de la técnica. Un antígeno en el presente documento se define como una sustancia reconocida por el sistema inmune como extraña o tóxica que provoca una respuesta inmune.

La proteína extraña o antígeno usado en la etapa a) está presente en forma de ácido nucleico, desde el que la propia proteína extraña se expresa en el huésped, en forma de bacteria recombinante que expresa la proteína extraña, de proteína en forma de proteína y/o en forma de proteína extraña que el vector vírico transporta.

En una realización preferente, el vector vírico es un virus vacuna modificado de Ankara (VMA).

De acuerdo con una realización preferente, la proteína de fusión comprende además un adaptador entre la ubiquitina y la proteína extraña. El adaptador preferentemente comprende aminoácidos que mejoran la estabilidad de la fusión ubiquitina/proteína, por ejemplo alanina en la posición 76 en la parte de la ubiquitina de la proteína de fusión o aminoácidos que llevan a la segmentación preferente de la parte de la ubiquitina, por ejemplo, glicina en la posición 76 en la parte de la ubiquitina de la proteína de fusión revelando de este modo aminoácidos contenidos dentro de la proteína de fusión que llevan a una degradación mejorada de esta parte de la proteína, por ejemplo, arginina en la posición 1 de la parte restante de la proteína de fusión y/o aminoácidos que contienen aminoácidos que sirven como señales de reconocimiento a las que van dirigidas más moléculas de ubiquitina dentro de la célula llevando de este modo a una degradación mejorada.

Como se usa en el presente documento, el término "VMA recombinante" significa aquellos VMA, que han sido genéticamente alterados, por ejemplo, mediante técnicas de recombinación de ADN y que se proporcionan para su uso, por ejemplo, como una vacuna o como un vector de expresión.

De acuerdo con la presente invención, los virus vacunas recombinantes VMA pueden prepararse mediante varias técnicas bien conocidas, proe ejemplo, el protocolo de selección basado en el gen *K1L*. Como un ejemplo, un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la proteína K1L del Virus Vacuna (VV) o un polipéptido derivado de *K1L* y una secuencia de ADN que codifica una proteína extraña (o una proteína de fusión de Ubiquitina/proteína extraña) ambas flanqueadas por secuencias de ADN que flanquean un lugar no esencial, por ejemplo, una delección que ocurre de manera natural, por ejemplo, una delección III, dentro del genoma VMA, se introduce a las células, preferentemente células eucariotas. Preferentemente se usan células aviarias, de mamíferos y humanas. Preferentemente, las células eucariotas son células BHK-21 (ATCC CCL-10), BSC-1 (ATCC CCL-26), CV-1 (ECACC 87032605) o MA104 (ECACC 85102918) infectadas productivamente con VMA mutante en las que las secuencias del gen *K1L* y sus secuencias promotoras en el genoma VMA o una parte funcional de dichas secuencias se han desactivado, para permitir la recombinación homóloga. Las células huéspedes preferentes adicionales son células fibroblastos de pollo, células fibroblastos de codorniz, células QT-9, células Vero, células MRC-5, células B o células primarias humanas (por ejemplo, células fibroblastos primarios, células dendríticas). Para más información véase el documento WO 04074493, que en el presente documento se incorpora en su totalidad.

Una vez que se ha introducido el constructo de ADN en la células eucariotas y *K1L* que codifica el ADN y el ADN externo se ha recombinado con el ADN vírico, es posible aislar el virus vacuna recombinante deseado VMA tras el paso en las células que necesitan la función *K1L* para mantener el crecimiento del virus, por ejemplo, células RK-13. La clonación de los virus recombinantes es posible de una manera conocida como purificación de placa (comparar Nakano y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1593-1596 [1982], Franke y col., Mol. Cell. Biol. 1918-1924 [1985], Chakrabarti y col., Mol. Cell. Biol. 3403-3409 [1985], Fathi y col., Virology 97-105 [1986]).

La construcción de ADN a insertarse puede ser lineal o circular. Un ADN circular se usa preferentemente. Es particularmente preferente usar un plásmido.

La construcción de ADN puede contener secuencias flanqueando el lado izquierdo y derecho de un lugar no esencial, por ejemplo, el lugar de la delección III, dentro del genoma VMA (Sutter, G. y Moss, B. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-10851), el lugar de la delección de *K1L* procesado dentro del genoma VMA o cualquier lugar no esencial dentro del genoma del VMA mutante de acuerdo con la presente invención.

- 5 La secuencia de ADN externo puede insertarse entre las secuencias que flanquean el lugar no esencial, por ejemplo, la delección que ocurre de manera natural.

La secuencia de ADN extraña puede ser un gen que codifica un polipéptido terapéutico, por ejemplo, proteínas segregadas, por ejemplo, polipéptidos de anticuerpos, quimioquinas, citoquinas o interferones, o un polipéptido de un agente patógeno que puede usarse preferentemente para fines de vacunación o para la producción de polipéptidos terapéuticos o científicos valiosos. Los agentes patógenos se entenderán que son virus, bacterias y parásitos que pueden causar una enfermedad, así como células tumorales que se multiplican de manera no restringida en un organismo y de este modo pueden llevar a crecimientos patológicos. Los ejemplos de tales agentes patógenos se describen en Davis, B.D. y col., (Microbiology, 3ª ed., Harper International Edition). Los genes preferentes de los agentes patógenos son aquellos del virus de la gripe, del sarampión y virus sincitiales respiratorios, de virus dengue, de virus de inmunodeficiencia humana, por ejemplo, VIH I y VIH II, de virus de hepatitis humana, por ejemplo, VHC y VHB, de virus del herpes, de virus del papiloma, del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, o de la *Micobacteria* causante de la tuberculosis.

Los genes preferentes que codifican los antígenos asociados con el tumor son aquellos de los antígenos de diferenciación asociados con el melanoma, por ejemplo, tirosinasa, proteínas 1 y 2 asociadas con la tirosinasa, de antígenos de cáncer de testículos, por ejemplo MAGE-1, -2, -3, y BAGE, de antígenos compartidos no tratados sobreexpresados sobre tumores, por ejemplo, Her-2/neu, MUC-1, y p53.

Las secuencias extrañas adicionales de uso en la presente invención son secuencias de polipéptido contenidas de epítopes artificiales o epítotope que contiene secuencias, por ejemplo minigenes, politopos, etc.

El constructo de ADN puede introducirse en las células mediante transfección, por ejemplo por medio de precipitación de fosfato cálcico (Graham y col., *Viol.* 52, 456-467 [1973]; Wigler y col., *Cell* 777-785 [1979], por medio de electroforación (Neumann y col., *EMBO J.* 1, 841-845 [1982], por microinyección (Graessmann y col., *Meth. Enzymology* 101, 482-492 [1983], por medio de liposomas (Straubinger y col., *Methods in Enzymology* 101, 512-527 [1983]), por medio de esferoblastos (Schaffner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2163-2167 [1980]) o mediante otros procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica. La transfección por medio de precipitación de fosfato cálcico se usa preferentemente.

Para preparar las vacunas, los VMA recombinantes de la presente invención se convierten en una forma fisiológicamente aceptable y después se combinan en el equipo de partes. Esto puede hacerse en base a los muchos años de experiencia en la preparación de vacunas usadas para la vacunación contra la viruela (Kaplan, *Br. Med. Bull.* 25, 131-135 [1969]). Normalmente, alrededor de 10^6 - 10^8 partículas del VMA recombinante se liofilizan en 100 ml de tampón fosfato salino (PBS) en presencia del 2 % de peptona y el 1 % de albúmina humana en una ampolla, preferentemente una ampolla de cristal. Más información en referencia a la dosis de VMA a ser administrada se indica más abajo. El liofilizado puede contener aditivos (tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona) u otras ayudas (tales como antioxidantes, estabilizadores, etc.) adecuados para la administración parenteral. La ampolla de cristal después se sella y puede almacenarse, preferentemente a temperaturas por debajo de -20 °C, durante varios meses.

Para la vacunación la liofilización puede disolverse en 0,1 a 0,2 ml de solución acuosa, preferentemente suero fisiológico, y administrarse parenteralmente, por ejemplo mediante inoculación intradérmica. La vacuna de acuerdo con la invención preferentemente se inyecta intracutáneamente. En el lugar de la inyección puede encontrarse un ligero hinchazón, rojez, algunas veces también picor (Stickl y col., supra). El modo de administración, la dosis y el número de administraciones puede optimizarse por aquellos expertos en la técnica de una manera conocida. Es conveniente cuando sea apropiado administrar la vacuna varias veces durante un largo periodo de tiempo con el fin de obtener respuestas inmunes de alto nivel contra el antígeno externo.

De acuerdo con una realización preferente, en el equipo de la presente invención, la proporción de la cantidad del primer componente con el segundo componente es de 1:5 a 1:20, preferentemente 1:10, medido como unidades infecciosas (UI) de partículas de VMA recombinante. Por ejemplo, las UI de VMA recombinante (que no contiene ubiquitina) usadas en la etapa de estimulación es 10^5 - 10^6 para un ratón. Esta es una cantidad comparablemente baja de partículas en comparación con los enfoques de la técnica anterior. La dosis usada para reforzar el animal con VMA recombinante (que contiene ubiquitina) es aproximadamente 10^6 - 10^7 para conseguir la misma respuesta de célula T que 10^7 - 10^8 UI de partículas recombinantes que no contienen ubiquitina (etapa de refuerzo de la técnica anterior). De este modo, el número de UI usadas en la etapa de refuerzo puede reducirse aproximadamente en un 90 % en relación con las técnicas de la técnica anterior.

El límite superior para la administración de VMA recombinante para seres humanos es aproximadamente 5×10^8 UI, y puede conseguirse una mejor respuesta inmune solamente usando una cantidad de VMA recombinantes

significativamente inferior que este límite superior.

De acuerdo con un segundo aspecto, el equipo de partes como el definido en el presente documento tiene como objeto usarse en la terapia anti-cáncer o en la prevención de enfermedades infecciosas.

5 De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención está además dirigida al uso de un equipo de partes como el definido en el presente documento para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para mejorar las respuestas de célula T en un mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar un equipo como el definido en el presente documento;
- b) potenciar un mamífero con una cantidad del primer componente efectivo para proporcionar una respuesta inmune primaria;
- 10 c) reforzar dicho mamífero con una cantidad del segundo componente efectivo para proporcionar una respuesta inmune primaria.

El equipo puede usarse preferentemente para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer o para la prevención de enfermedades infecciosas.

15 De acuerdo con otra realización preferente la etapa de refuerzo se realiza en la semana 2-12, preferentemente 4-8 después de la etapa de estimulación. Como se ha mencionado anteriormente, el equipo de partes como el desvelado en el presente documento se usa en un procedimiento de vacunación.

Preferentemente, el mamífero tratado es un ser humano.

20 En un procedimiento alternativo, las células dendríticas (CD) se aíslan de pacientes o se generan *ex vivo* y se infectan con VMAR que expresan antígeno ubiquitinado de acuerdo con la invención. Estas CD infectadas pueden después transferirse adoptivamente de vuelta a los pacientes como una vacuna con el fin de estimular directamente células T que no han sido expuestas o para expandir las células T existentes específicas para el respectivo antígeno. Estas CD infectadas también pueden usarse para estimular o expandir células T *in vitro* con el fin de transferir adoptivamente estas células T generadas *in vitro* al receptor.

25 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un VMA recombinante, que transporta una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende:

- ubiquitina o una parte funcional de la misma, cuyas partes funcionales contienen una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje; y
- 30 - una o más proteínas extrañas, es decir, una o más proteínas que no están presentes de modo natural como una parte de VMA o partes funcionales de las mismas, cuya parte funcional comprende una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje,

35 para su uso en terapia anti-cáncer o en la prevención de enfermedades infecciosas como un agente de refuerzo en vacunaciones de sensibilización y refuerzo.

Como se ha mencionado anteriormente, sorprendentemente resultó que esta VMA recombinante está mostrando respuestas inmunes secundarias mejoradas independientes de la proteína extraña involucrada.

Los materiales, procedimientos, y ejemplos son solamente ilustrativos.

La invención se ilustra ahora más mediante las figuras acompañantes, en las que se muestra lo siguiente:

40 **FIG. 1.** Construcción de VMARec que expresa un gen de fusión ubiquitina/tirosinasa bajo control del promotor P7.5 específico del virus vacuna. (A) El mapa esquemático del lugar de inserción en el genoma vírico (deleción III), y los constructos víricos intermedios y finales obtenidos después de la recombinación homóloga. (B) El gen de fusión ubiquitina recombinante/tirosinasa obtenido después de hibridización PCR (Gel de Agarosa). Como un control, también se muestran fragmentos de ADN sencillo de ubiquitina o tirosinasa.

45 **FIG. 2.** El análisis de transferencia Western de expresión de gen tirosinasa humano en células BHK infectadas con VMARec que codifica tirosinasa auténtica (VMA-hTir P7.5) o ubiquitinada (VMA-ubi/hTir P7.5) o VMA parental (VMA-wt). Las células se cosecharon en las horas indicadas tras la infección (h.t.i.). Los lisados celulares se separaron mediante 8 % SDS-PAGE. La mancha de este gel se sondó después con anti-tirosinasa mAb T311 y anticuerpo secundario IgG anti-ratón etiquetado con peroxidasa, y se visualizó por quimioluminiscencia mejorada (QLM).

50 **FIG. 3.** El antígeno que presenta capacidad de células dianas infectadas con VMARec que expresa tirosinasa humana bajo control del promotor específico del virus vacuna P7.5 (VMA- hTir P7.5 (●)) o en una forma

ubiquitinada (VMA-ubi/hTir P7.5) (■). La lisis específica por CTL murino restringido de A*0201 reactivo contra epítipo péptido de tirosinasa humano 369-377 se determinó en un ensayo de liberación 6-h[⁵¹Cr].

FIG. 4. Las respuestas de célula T CD8+ primarias específicas de tirosinasa en fase aguda inducidas por la inmunización sencilla con virus VMAREC que producen tirosinasa auténtica o ubiquitinada. Los ratones HHD fueron estimulados con 10⁷ UI de VMA-hTir 7.5 (barra gris), VMA-ubi/hTir P7.5 (barra negra) o VMA-wt (barra blanca). Las respuestas de VMA y de célula T específica de tirosinasa se analizaron el día 8. (A) Los esplenocitos se tiñeron con tetrámeros A2Kb quiméricos específicos del epítipo de tirosinasa humano 369-377, el epítipo VP35#1 de VV o el epítipo 435 de HER-2 como un control. (B) Los esplenocitos fueron péptidos estimulados con el epítipo de tirosinasa humano 369-377, el epítipo VP35#1 VV o el epítipo 435 de HER-2 como un control y después se examinaron para producción Interferón y intracelular (ICS). Todos los resultados se expresan como promedio ± s.d para cuatro ratones.

FIG. 5. Las respuestas de célula T CD8+ secundarias específicas de tirosinasa en fase aguda inducidas por inmunización de sensibilidad y refuerzo de ADN-VMA heterólogo. Los ratones A2Kb se estimularon dos veces i.m con vacuna de ADN que codifica tirosinasa y se reforzaron una vez i.p con 10⁷ UI de VMAREC que producía tirosinasa auténtica (VMA-hTir) o ubiquitinada (VMA-ubi/hTir). Los esplenocitos se analizaron el día 5 después de la última vacunación para especificidad para el epítipo de tirosinasa humana 369-377 bien mediante tinción de tetrámero quimérica de A2Kb (A) o ICS (B). Los resultados son representativos para al menos tres experimentos independientes.

FIG. 6. Las respuestas de célula T CD8+ secundarias específicas de tirosinasa en fase aguda inducidas por inmunización de sensibilidad y refuerzo ADN-VMA heteróloga. Los ratones HHD se estimularon i.p con 10⁷ UI de VMAREC que producía tirosinasa auténtica (VMA-hTir) y se reforzaron i.p con 10⁸ UI de VMAREC que producía tirosinasa ubiquitinada (VMA-ubi/hTir). Los esplenocitos se cosecharon el día 5 después de la última vacunación, el péptido se estimuló con el epítipo de tirosinasa humano 369-377, el epítipo B22R de VV o el epítipo 435 de HER-2 como un control y después se examinaron para producción de Interferón y intracelular (ICS).

FIG. 7. El experimento de pulso y caza de células RMA infectadas con VMAREC que codifican tirosinasa auténtica (VMA-hTir P7.5) o ubiquitinada (VMA-ubi/hTir P7.5) o VMA parental (VMA-wt). 5 horas después de la infección las células se cosecharon durante 20 minutos y después se pulsaron durante 45 minutos con 50 µCi de Metionina y Cisteína con etiqueta ³⁵S, y después se cazaron con medio RPMI. La inmunoprecipitación se realizó en puntos temporales indicados con anti-tirosinasa mAb C-19. Los precipitados se separaron mediante 8 % SDS-PAGE y se visualizaron sobre un generador de imágenes de fósforo. La semivida *in vivo* de tirosinasa ubiquitinada se reduce significativamente y puede estimarse que es inferior a 30 minutos, mientras que la semivida *in vivo* de tirosinasa auténtica se ha estimado que es superior a 10 horas (Jiménez y col., 1988).

Fig. 8. Inmunoprecipitación de tirosinasa ubiquitinada humana expresada por VMAREC en células RMA y HeLa infectadas.

Fig. 9. La inmunogenicidad de VMA-ubi/hTir *in vivo*: las respuestas de célula T CD8+ específicas de tirosinasa-epítipo restringidas por HLA- A*0201 después de la vacunación de sensibilización y refuerzo VMA/VMA de ratones HHD (recuerdo). Todos los ratones se estimularon con VMA-hTIR con 10e5 UI (A) o 10e7 UI (B) y se reforzaron con VMA-Ub-hTir o VMA-hTir o MVA-hTir en 10e7 UI. Los esplenocitos se examinaron para producción de Interferón y intracelular el día 5 después del refuerzo.

Fig. 10. La citotoxicidad *in vivo* muy eficiente de VMA-Ub/hTir en comparación con animales reforzados con VMA-hTir después de comparablemente vacunas primarias en dosis bajas. Los ratones HHD se estimularon con 10⁷ (A) o 10⁶ (B) UI de VMA-hTir y después se reforzaron el día 30 después de la estimulación con 10⁷ UI de VMA-hTir o VMA-Ub/hTir. La eliminación rápida *in vivo* de esplenocitos autólogos inyectados i.v etiquetados con el epítipo de tirosinasa humana 369-377 o el epítipo 435-443 de HER-2 como un control se evaluó el día 5 después del refuerzo. La lisis específica 5h-*in vivo* de células dianas en la sangre o el bazo se compara para diferentes dosis de estimulación como se indica.

Fig. 11. Las respuestas de célula T CD8+ secundarias específicas de tirosinasa en fase aguda reforzadas por inmunización con células que se sometieron a transducción con VMAREC antes de la inmunización. Los ratones HHD se estimularon i.p con 10⁷ UI de VMAREC que producía tirosinasa auténtica (VMA-hTir) y se reforzaron i. p con 10⁶ células RMA-HHD que se infectaron con 10 UI/célula de VMAREC que producía tirosinasa auténtica (VMA-hTir) o tirosinasa ubiquitinada (VMA-ubi/hTir). Los esplenocitos se cosecharon el día 5 después de la última vacunación, el péptido se estimuló con el epítipo de tirosinasa humano 369-377 o el epítipo 435-443 de HER-2 y se examinaron para producción de Interferón y intracelular (ICS).

Ejemplos:**Material y Procedimientos****Construcción de Plásmido**

5 Un gen de fusión ubiquitina/tirosinasa se construyó para clonarse en el vector de transferencia VMA pIIIHR-P7.5. Aquí, los presentes inventores establecieron una técnica de hibridación-PCR en la que el gen de ubiquitina (Ub) podía fusionarse con el cADN de tirosinasa (hTir) sin inserción de ninguna secuencia adicional de ADN no-Ub o no-hTir. Cuando la ubiquitina expresada como una fusión para proteína se parte por las proteasas citosólicas en su residuo G76, los presentes inventores tuvieron como objetivo mutar G76 a A76 que ha demostrado prevenir segmentaciones citosólicas cuando el vector plásmido los expresa (Rodríguez F y col. J. Virol, 1997).

10 En una primera etapa, la ubiquitina se amplificó de una preparación de ARN de células de melanoma murino B16 en un PCR de transcriptasa inversa convencional (Titan One Tube RT-PCR System, Roche) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Los cebadores 5'-GGG CGG ATC CGA CCA TGC AGA TCT TCG TGA AGA CCC TGAC-3' y 5'-CAA AAC AGC CAG GAG CAT CGC ACC TCT CAG GCG AAG GAC CAG-3' se eligieron con el fin de crear un lugar de restricción *Bam*HI (subrayado) en el extremo 5' del fragmento resultante y una superposición 15 bp con hTir en el extremo 3' y, además, para mutar el residuo de ubiquitina G76 a A76 (residuos en latín y subrayados).

15 En una segunda etapa, la tirosinasa humana se amplificó mediante PCR convencional del plásmido pcADNI-hTir (Drexler y col, Cancer Res, 1999). Los cebadores 5'-CGC CTG AGA GGT GCG ATG CTC CTG GCT GTT TTG TAC TGC CTG- 3' Y 5'-GGG CGT TTA AAC TTA TAA ATG GCT CTG ATA CAA GCT GTG GT- 3' extendieron el hTir cADN con una superposición de 18 bp a ubiquitina en el extremo 5' y un lugar de restricción *Pme*I en el extremo 3' (subrayado).

20 Los fragmentos resultantes se purificaron (equipo de purificación PCR, Qiagen) y se usaron como plantillas en una hibridación PCR con los cebadores 5' – GGG CGG ATC CGA CCA TGC AGA TCT TCG TGA AGA CCC TGA-3' y 5'-GGG CGT TTA AAC TTA TAA ATG GCT CTG ATA CAA GCT GTG GT-3'. Para crear el vector de transferencia de VMA pIIIHR-P7.5-Ub-hTir, el gen fusionado ubiquitina/tirosinasa (Ub-hTir) se clonó en el único lugar de restricción *Bam*HI/*Pme*I de pIIIHR-P7.5, que contenía el promotor temprano/tardío P7.5, las secuencias de gen *lacZ*, el gen de la selección de variedad del huésped K1L y las secuencias flanqueantes VMA-ADN para la integración en la delección III del genoma VMA.

25 El vector pIIIHR-P7.5-Ub-hTir se transfirió después a *Escherichia coli* DH10B (Gibco) mediante electroporación y se seleccionó a través de resistencia para ampicilina. El plásmido-ADN se amplificó y preparó (Maxiprep Kit, Qiagen).

30 Generación de Virus Recombinantes

Los virus recombinantes se obtuvieron mediante recombinación homóloga seguida de selección de variedad de huésped pasajero como se ha descrito previamente (Staib y col., 1004). En resumen, las monocapas de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) crecieron hasta el 80 % de confluencia en placas de cultivo de seis pocillos y después se infectaron con VMA-wt en una multiplicidad de infección (MDI) de 0,01 por célula. Una hora después de la infección 35 las células se transfectaron con el plásmido pIIIHR-P7.5-Ub-hTir usando un agente de transfección (FuGENE6, Roche) y se incubaron durante 8 horas en un medio RPMI libre de suero. Después, las células se lavaron y cosecharon después de 48 horas de incubación en RPMI/10 %FCS, se congelaron y descongelaron 3x y se sometieron a ultrasonido en un sonicador de copa. Los virus liberados se diluyeron en serie y se usaron para infectar las células del riñón de un conejo (RK-13) para la selección de variedad de huésped. Las placas microscópicamente 40 típicas se examinaron para los genes recombinantes y wt-ADN después de 2-3 pasos de placa sobre las células RK13 mediante la extracción de ADN y PCR. Las placas libres de VMA-wt que producían VMA-Ub-hTir recombinante se usaron para continuar con la purificación de placas sobre las células CEF para eliminar el gen de variedad de huésped K1L y después se amplificaron. Las reservas víricas se purificaron, se les asignó un título y se analizaron mediante PCR para la ausencia de VMA-wt y presencia de VMA-Ub-hTir.

45 Análisis de transferencia Western

El análisis de transferencia Western confirmó la expresión y degradación de tirosinasa ubiquitinada. Las células de riñón de cría de hámster (BHK), los fibroblastos de ratón (NIH 3T3), las células de linfoma T murino (RMA) y las células de carcinoma del cuello de útero humano (HeLa) se infectaron con MOI=10 de VMArec que codificaba 50 tirosinasa auténtica (VMA-hTir P7.5) o ubiquitinada (VMA-Ub-hTir P7.5) o VMA parental (VMA-wt) en presencia de inhibidores de proteasoma específicos cuando se indicó. Las células se cosecharon en los tiempos indicados, se congelaron y descongelaron y se sometieron a ultrasonido. La inmunoprecipitación se realizó cuando se indicó (s.a. Fig. 8). Los lisados celulares se resolvieron mediante electroforesis sobre un gel de poliacrilamida SDS-8 % y se sometieron a electrotransferencia por adsorción en nitrocelulosa durante 1 hora en un tampón que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina, y el 20 % metanol (pH 8,6). Las manchas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en un tampón de bloqueo PBS que contenía el 1 % de BSA y el 0,2 % de NP40 y después se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con mAb T311 (Novocastra) diluido 100 veces en tampón de bloqueo. Después de lavarse con el 0,1 %de NP40 en PBS, las manchas se incubaron durante 1 hora a temperatura 55

ambiente con anticuerpo secundario IgG de anti-ratón etiquetado con peroxidasa de rábano (Dianova), y se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada (QLM).

Resultados: La tirosinasa ubiquitinada expresada por VMA-Ub-Tir es ligeramente mayor en tamaño que la tirosinasa auténtica expresada por VMA-Tir, lo que refleja la fusión con monoubiquitina 8kD. La tirosinasa ubiquitinada expresada por VMA-Ub-Tir fue solamente detectable en presencia de inhibidores de proteasoma específicos, que no afectaron a la expresión o detección de tirosinasa auténtica. No hubo diferencias entre los dos constructos en la cantidad total de proteína expresada cuando la proteasoma se inhibió eficientemente. Sin la inhibición de la proteasoma, la cantidad de proteína de tirosinasa ubiquitinada estuvo por debajo del nivel de detección de análisis de transferencia western, lo que indica que la ubiquitinación de tirosinasa da como resultado la rápida degradación dependiente de proteasoma.

Inmunoprecipitación

Los lisados celulares se prepararon como se ha descrito para el análisis de transferencia Western y se incubaron con 0,2 µg de mAb C-19 (Santa Cruz Biotech, Heidelberg) durante 1 hora a 4 °C sobre un dispositivo de balanceo. Después se añadieron 20 µl de Proteína-G-Agarosa cuidadosamente agitada (Santa Cruz Biotech, Heidelberg) y las sondas se incubaron durante la noche a 4 °C sobre un balancín.

Experimentos de Pulso y Caza y Radioinmunoprecipitación

Los experimentos de Pulso y Caza se realizaron con células RMA infectadas con VMArec que codificaba tirosinasa auténtica (VMA-hTir P7.5) o ubiquitinada (VMA-Ub-hTir P7.5) o VMA parental (VMA-wt). 5 horas después de la infección las células fueron privadas de alimentos durante 20 minutos con medio de Dubecco libre de met/cis que contenía ultraglutamina y piruvato el 1 % cada uno, después se pulsaron durante 45 minutos con 50µCi de metionina y cisteína etiquetadas ³⁵S, y después se cazaron con medio RPMI. La inmunoprecipitación se realizó en los tiempos indicados con anti-tirosinasa mAb C-19. Los precipitados se separaron mediante 8 % SDS-PAGE y se visualizaron sobre un generador de imágenes de fósforo.

Resultados: Los experimentos de Pulso y Caza mostraron cantidades similares de proteínas etiquetadas con radio expresadas por VMA-hTir y VMA-Ub-hTir. De nuevo, la tirosinasa ubiquitinada mostró el aumento de tamaño esperado. La tirosinasa auténtica expresada por VMA-Tir estuvo estable durante el periodo de observación de 4 horas, mientras que la tirosinasa ubiquitinada expresada por VMA-Ub-Tir fue sometida a una rápida degradación. La semivida *in vivo* de la tirosinasa ubiquitinada se redujo significativamente y pudo estimarse que fuera inferior a 30 minutos. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de los presentes inventores, la semivida *in vivo* de la tirosinasa auténtica se ha estimado que es superior a 10 horas (Jiménez y col., 1998).

Ensayos de Liberación de Cromo

La lisis específica por CTL murino restringido por A*0201 reactivo contra epítipo de péptido de tirosinasa humana 369-377 se determinó en un ensayo de 6 horas de liberación [⁵¹Cr]. En resumen, las células A375 positivas HLA-A*0201 se infectaron durante 3 horas con VMA-wt, VMA-hTir o VMA-Ub-hTir y en MOI de 5, se lavaron una vez, se etiquetaron durante 1 hora a 37 °C con 100 µCi Na⁵¹CrO₄, y después se lavaron cuatro veces. Las células dianas etiquetadas se colocaron en placas con 96 pocillos con fondo de U en 1 x 10⁴ células/pocillo y se incubaron durante 8 horas adicionales a 37 °C. Quince horas después de la infección, las células efectoras se incubaron con las células dianas en varias proporciones E:D. Después de 6 horas, se recogieron 100 µ de sobrenadante por pozo, y se determinó la liberación específica de ⁵¹Cr.

Resultados: La ubiquitinación de tirosinasa dio como resultado un reconocimiento de CTL específico de Tir significativamente mejorado de células dianas infectadas que indican el mayor procesamiento de péptido y la disponibilidad de densidades más altas de péptido I de clase MHC sobre la superficie celular incluso en puntos temporales más tempranos durante la infección vírica.

Ratones y Programas de Vacunación

Los ratones transgénicos HLA- A*0201 o A2K^b se derivaron de reproducción interna bajo condiciones libres de patógenos específicos. Los ratones fueron vacunados con las dosis indicadas de VMA rec (i.p) o ADN (i.m). Para las respuestas de célula T CD8+ primarias específicas de tirosinasa en fase aguda inducidas por la inmunización sencilla los ratones se analizaron el día 8 después de la vacunación. Para las respuestas de célula T CD8+ secundarias específicas de tirosinasa en fase aguda inducidas por la inmunización se sensibilización y refuerzo con VMA-VMA o ADN-VMA los ratones se estimularon una vez (VMArec) y se reforzaron el día 30 después de la estimulación o los ratones se estimularon dos veces (ADN) en un intervalo de una semana y se reforzaron el día 30 después de la primera estimulación, y se analizaron el día 5 después de la última inmunización. Los ratones se sacrificaron y los bazos se cosecharon para analizarse por ICS o ensayos de enlace de tetrámero.

Tinte de Citoquina Intracelular

Los esplenocitos de ratones vacunados fueron péptidos estimulados con epítotope de tirosinasa humana 369-377, los epítotope VP35# de VV o B22R o el epítotope 435 de HER-2 como un control durante 5 horas; para las últimas 3 horas se añadió Brefeldin A (GolgiPlug, Pharmingen). La tinción de la citoquina intracelular para IFN γ se realizó usando el equipo Cytotifx/Cytoperm (Pharmingen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los datos se adquirieron sobre un FACSCalibur o un FACSCanto (ambos de Becton Dickinson). Los datos adquiridos se analizaron además con el software FLOWJO (Tree Star).

Análisis de Celula T Fenotípica mediante Tinción de Tetrámero de MCH

Los reagentes de tetrámero A2K^b quiméricos se generaron como se ha descrito (Busch y col., 1998). Las células se incubaron con monacita de etidio (Molecular Probes) para discriminación de vivos/muertos y anti-Ratón-Fc-AB para evitar el enlace no específico del marcador de superficie Abs, se lavaron tres veces, y le siguió la tinción del tetrámero MHC y el marcador de superficie con mAbs anti-CD8 α (clon 53-5,8) y anti-CD62L (clon MEL-14) (ambos de Pharmingen) durante 45 minutos y se lavaron de nuevo tres veces. Todas las etapas se realizaron a 4 °C. Los datos se adquirieron sobre un FACSCalibur o un FACSCanto (ambos de Becton Dickinson). Los datos adquiridos se analizaron además con el software FLOWJO (Tree Star).

Resultados: Las respuestas de células T CD8+ (CTL) citotóxicas específicas de tirosinasa provocadas a través de un refuerzo con VMA-Ub-hTir mostraron un incremento doble en células que producían Interferón- γ y hasta un incremento triple en células de enlace de tetrámero en comparación con VMA-hTir. Esta habilidad de VMA-Ub-hTir para mejorar más eficientemente las respuestas de memoria CTL específicas de Tir en ratones que habían sido estimulados con ADN o VMA-hTir fue demostrada en ambos, los ratones A2K^b y HHD. Sorprendentemente, VMA-Ub-hTir podía provocar fuertes respuestas de recuerdo después de una vacunación de estimulación de solamente 10e5 UI de VMA-hTir en comparación con 10e7 UI que fueron necesarias para provocar una cantidad comparable de células T CD8+ específicas de epítotope que producen Interferón- γ cuando se reforzaron con VMA-hTir (Fig. 9).

En el presente ejemplo, el uso de VMAREC que expresa un antígeno ubiquitinado para provocar respuestas inmunes secundarias permitió hasta una reducción multiplicada por 100 de dosis víricas para inmunizaciones primarias. Estos datos muestran que el uso de VMAREC que expresa antígenos ubiquitinados para reforzar respuestas inmunes secundarias pueden provocar respuestas más fuertes de célula T CD8+ citotóxicas específicas de antígeno diana en dosis significativamente más bajas. De manera importante, esto también demostró que el requisito de dosis más bajas para la estimulación fue además la reducción de células T CD8+ específicas de VV en respuestas secundarias contra, por ejemplo, el epítotope B22R de VV.

Ensayo CTL in vivo

Los esplenocitos autólogos de ratones que no habían sido expuestos se prepararon y dividieron en dos grupos. Un grupo se pulsó con el epítotope de tirosinasa humana 369-377 (1 μ M) y después se etiquetó con una alta concentración (5 μ M) de éster 5,6-carboxi-fluoresceína succinimidil (CFSE, Molecular Probes), el otro grupo se pulsó con el epítotope 435-443 de HER-2 (1 μ M) como un control y después se etiquetó con una baja concentración de CFSE (0,5 μ M). Para la etiquetación CFSE 10⁷ células pulsadas de péptido/ml PBS se incubaron con CFSE a 37 °C en una incubadora el 5 % de CO₂ durante 10 minutos. Para parar la reacción de etiquetación se añadieron 20 ml de RPMI/10 %/FCS. Después de lavarlas tres veces con PBS para quitar el CFSE libre, 1x10⁷ células de cada grupo se mezclaron 1:1 en 200 μ l de PBS por ratón receptor para inyección intravenosas a través de la vena de la cola. Los bazo y la sangre del ratón receptor se cosecharon después de 5 horas, se analizaron para lisis específica de células dianas sobre el clitómetro FACSCanto (Becton-Dickinson). Al menos se adquirieron 5.000 células etiquetadas con CFSE "bajo". La lisis específica in vivo se calculó de la siguiente manera: 100 - [(% CFSE "alto" en respondedor vacunado / CFSE "bajo" en respondedor vacunado) / (% CFSE "alto" en respondedor que no ha sido expuesto / CFSE "bajo" en respondedor que no ha sido expuesto)] x 100).

LISTADO SECUENCIAL

- <110> GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
- <120> Vacuna VMA
- <130> P20168
- <140> PCT
- <141> 2006-04-24
- <150> EP 05001362.2
- <151> 2005-01-27
- <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.3

ES 2 380 731 T3

<210> 1
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 1
gggCGGATCC gaccatgcag atcttcgtga agaccctgac
40

10 <210> 2
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
15 <223> Cebador

<400> 2
caaaacagcc aggagcatcg cacctctcag gcgaaggacc ag
42

20 <210> 3
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 3
cgctgagag gtgCGATGCT cctggctgtt ttgtactgcc tg
42

<210> 4
<211> 41
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
35 gggCGTTAA acttataaat ggctctgata caagctgtgg t
41

<210> 5
<211> 40
<212> ADN
40 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
45 gggCGGATCC gaccatgcag atcttcgtga agaccctgac
40

<210> 6
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador

ES 2 380 731 T3

<400> 6
gggcgttttaa acttataaat ggctctgata caagctgtgg t
40

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento que incluye un equipo de partes que comprende los siguientes componentes:
 - 5 a) un primer componente que comprende una o más proteínas extrañas o un ácido nucleico que codifica las mismas o partes funcionales de las mismas, cuyas partes funcionales contienen una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje; y
 - b) un segundo componente que comprende un Virus Vacuna Modificado de Ankara (VMA), que transporta una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende:
 - 10 - ubiquitina o una parte funcional de la misma, cuya parte funcional contiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje; y
 - una o más proteínas extrañas, es decir, una o más proteínas que no están presentes de modo natural como una parte del VMA o partes funcionales de las mismas, cuya parte funcional comprende una o más
 - 15 sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje;

en el que la una o más proteínas extrañas son las mismas en a) y b), y
 en el que los primeros y segundos componentes comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 2. El medicamento de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión comprende además un adaptador entre la ubiquitina y la proteína extraña.
3. El medicamento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína extraña es una proteína heteróloga derivada del grupo consistente en polipéptidos terapéuticos y polipéptidos de agentes patógenos y partes funcionales de los mismos.
- 25 4. El medicamento de la reivindicación 3, en el que el polipéptido terapéutico se deriva de un grupo consistente en proteínas segregadas, por ejemplo, polipéptidos de anticuerpos, quimioquinas, citoquinas o interferones, o en el que el agente patógeno se deriva del grupo consistente en virus, preferentemente seleccionados del grupo consistente en virus de la gripe, sarampión y virus sincitiales respiratorios, virus de dengue, virus de inmunodeficiencia humana, virus de hepatitis humana, virus del herpes o virus de papiloma; bacterias, preferentemente *Micobacteria* causante de la tuberculosis; protozoos, preferentemente *Plasmodium falciparum*; y parásitos así como células tumorales o
- 30 antígenos asociados a la célula tumoral y partes funcionales de los mismos.
5. El medicamento de la reivindicación 4, en el que el antígeno asociado a la célula tumoral se selecciona del grupo consistente en antígenos de diferenciación asociados con melanoma, por ejemplo, tirosinasa, proteínas 1 y 2 relacionadas con tirosinasas, de antígenos de cáncer de testículos, por ejemplo, *MAGE-1,-2,-3*, y *BAGE*, y de antígenos compartidos no mutados sobreexpresados en tumores, por ejemplo, *Her-2/neu*, *MUC-1* y *p53*.
- 35 6. El medicamento de una o más de las reivindicaciones 1-5, en el que las regiones que codifican la proteína de fusión y/o la proteína extraña está cada una flanqueada por secuencias de ADN, que flanquean un lugar no esencial dentro del genoma del VMA, en el que el lugar no esencial es preferentemente el lugar de deleción III en el genoma del VMA.
- 40 7. El medicamento de una o más de las reivindicaciones 1-6, en el que la proporción de la cantidad del primer componente con el segundo componente es de 1:5 a 1:20, preferentemente 1:10, medida como unidades infecciosas (UI) de partículas de VMA recombinante.
8. El medicamento de una o más de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la terapia anti-cáncer o en la prevención de enfermedades infecciosas.
- 45 9. El medicamento de una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que un vector vírico transporta los ácidos nucleicos del componente a).
10. El medicamento de la reivindicación 9, en el que el vector es VMA.
11. Un medicamento como el definido en una o más de las reivindicaciones 1-10 para sus uso en un procedimiento para mejorar las respuestas de célula T en un mamífero, preferentemente un ser humano, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 50 a) proporcionar un medicamento como el definido en una o más de las reivindicaciones 1-10;
 - b) estimular a un mamífero con una cantidad del primer componente efectivo para proporcionar una respuesta inmune primaria;
 - c) reforzar dicho mamífero con una cantidad del segundo componente efectivo para proporcionar una

respuesta inmune secundaria.

12. El medicamento de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de cáncer o para su uso en la prevención de enfermedades infecciosas.

5 13. El medicamento de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que la etapa de refuerzo se realiza en la semana 2-12, preferentemente 4-8 después de la etapa de estimulación.

14. El medicamento de las reivindicaciones 11-13 para su uso en un procedimiento de vacunación.

15. Un VMA recombinante que transporta una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende:

10 - ubiquitina o una parte funcional de la misma, cuya parte funcional contiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje; y

15 - una o más proteínas extrañas, es decir, una o más proteínas que no están presentes de modo natural como una parte del VMA o partes funcionales de las mismas, cuya parte funcional comprende una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones cuando se compara con la proteína de tipo salvaje aunque tiene la misma función que la proteína de tipo salvaje,

para su uso en terapia anti-cáncer o en la prevención de enfermedades infecciosas como un agente de refuerzo en vacunaciones de sensibilización y refuerzo.

20

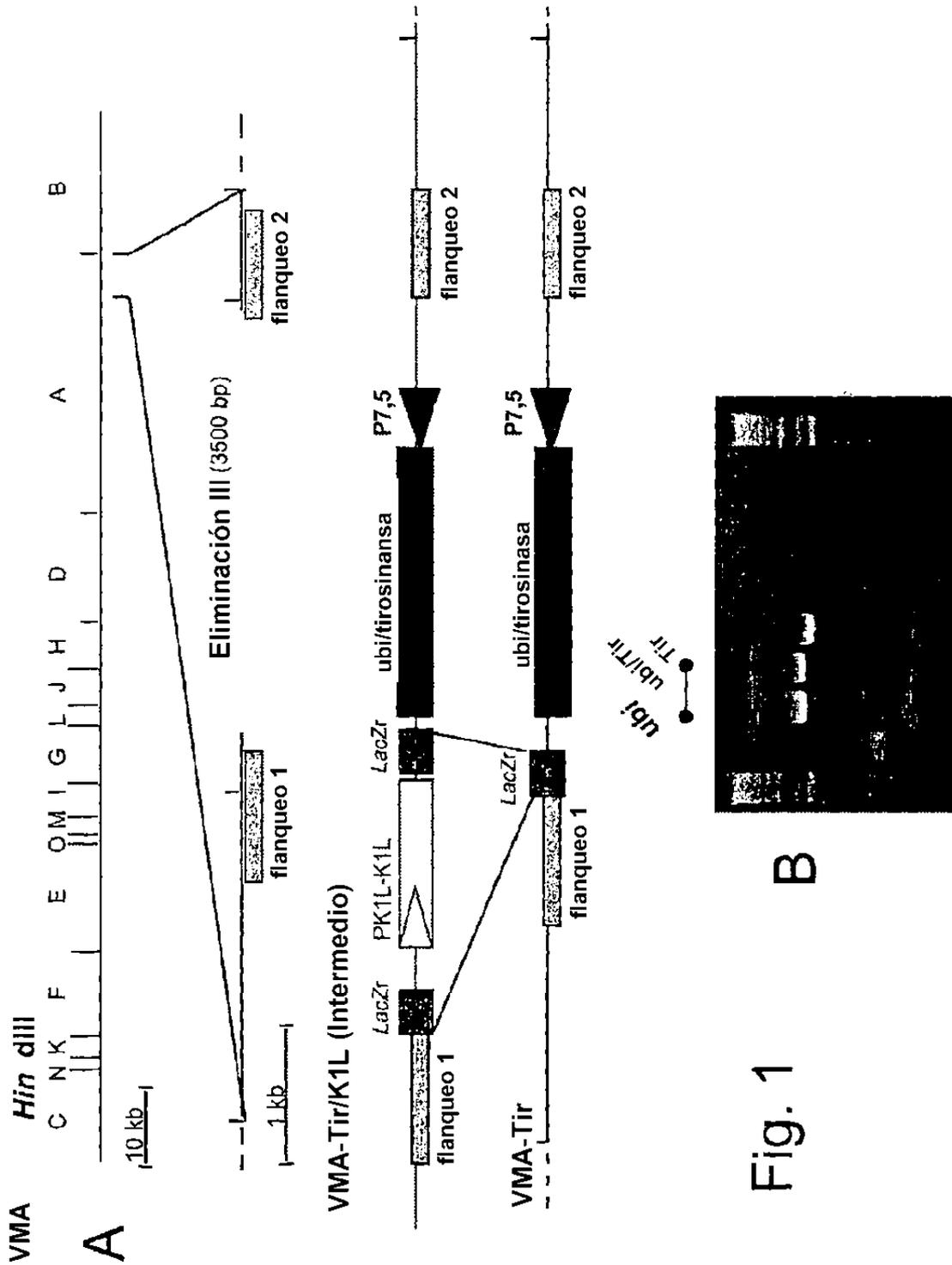
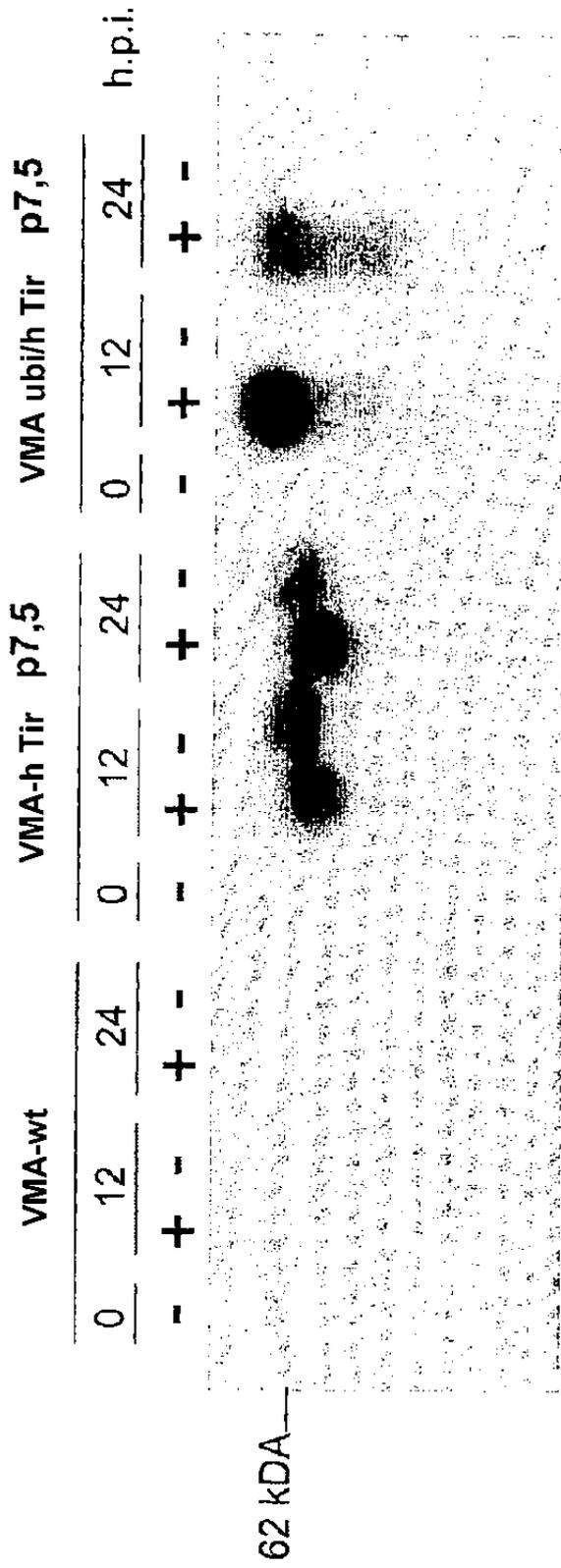


Fig. 1

Análisis de radioinmunotransferencia de síntesis de tirosina humana ubiquitinada por células infectadas por recVMA



+ Inhibición de proteasoma con lactacistina + P11 + MG-132

- Sin inhibición

Fig. 2

Antígeno que presenta capacidad de células dianas humanas infectadas con recVMA que producen la proteína de fusión ubiquitina/tirosinasa para CTL murino específico de hTir369 restringido por A2.1.

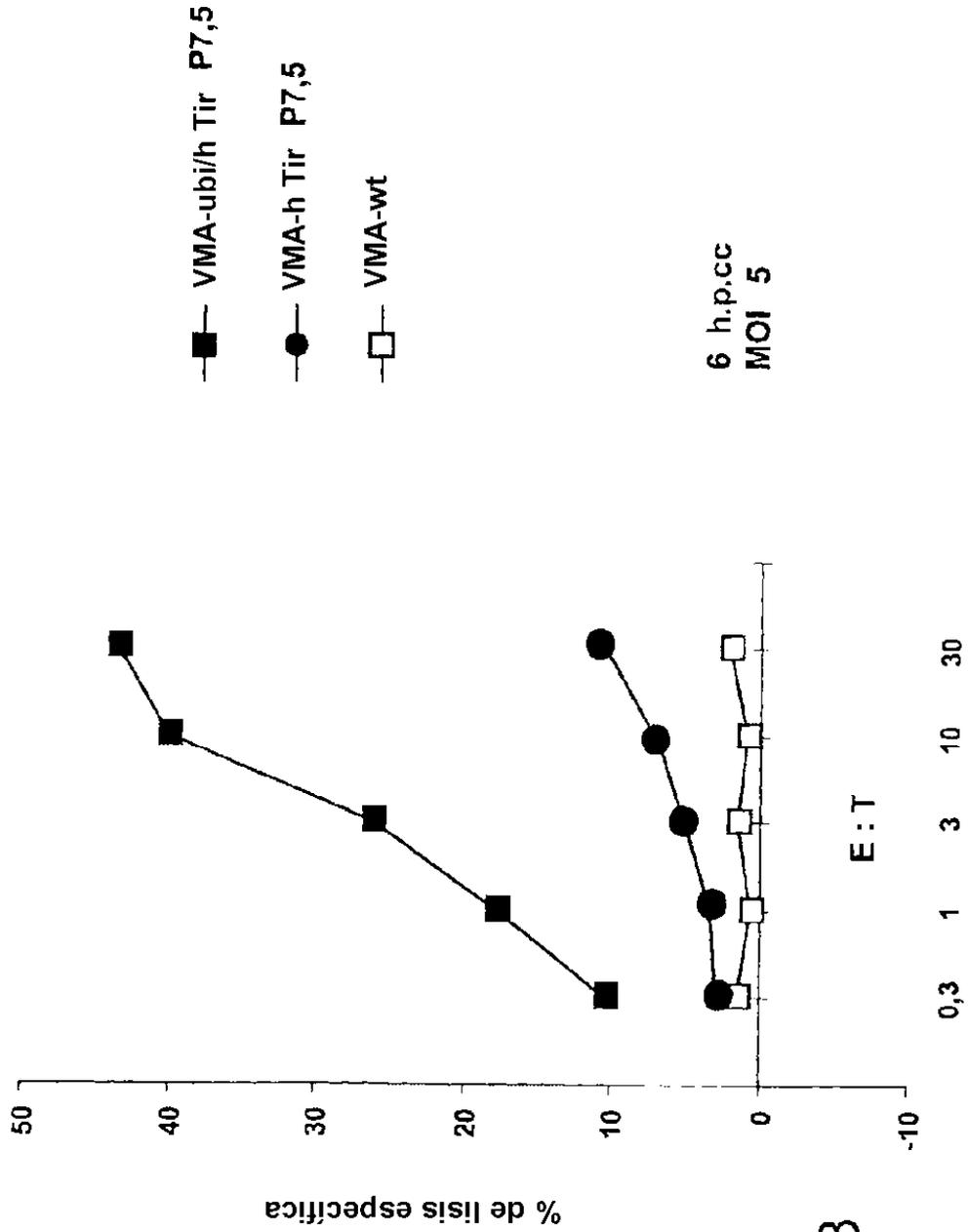


Fig. 3

Inmunogenicidad de VMA-ubi/h Tir *in vivo*: respuestas de célula T CD8+ específicas de epítope de virus vacuna y de tirosinasa restringida por HLA-A* 0201 determinadas después de la vacunación de ratones HHV (estimulación)

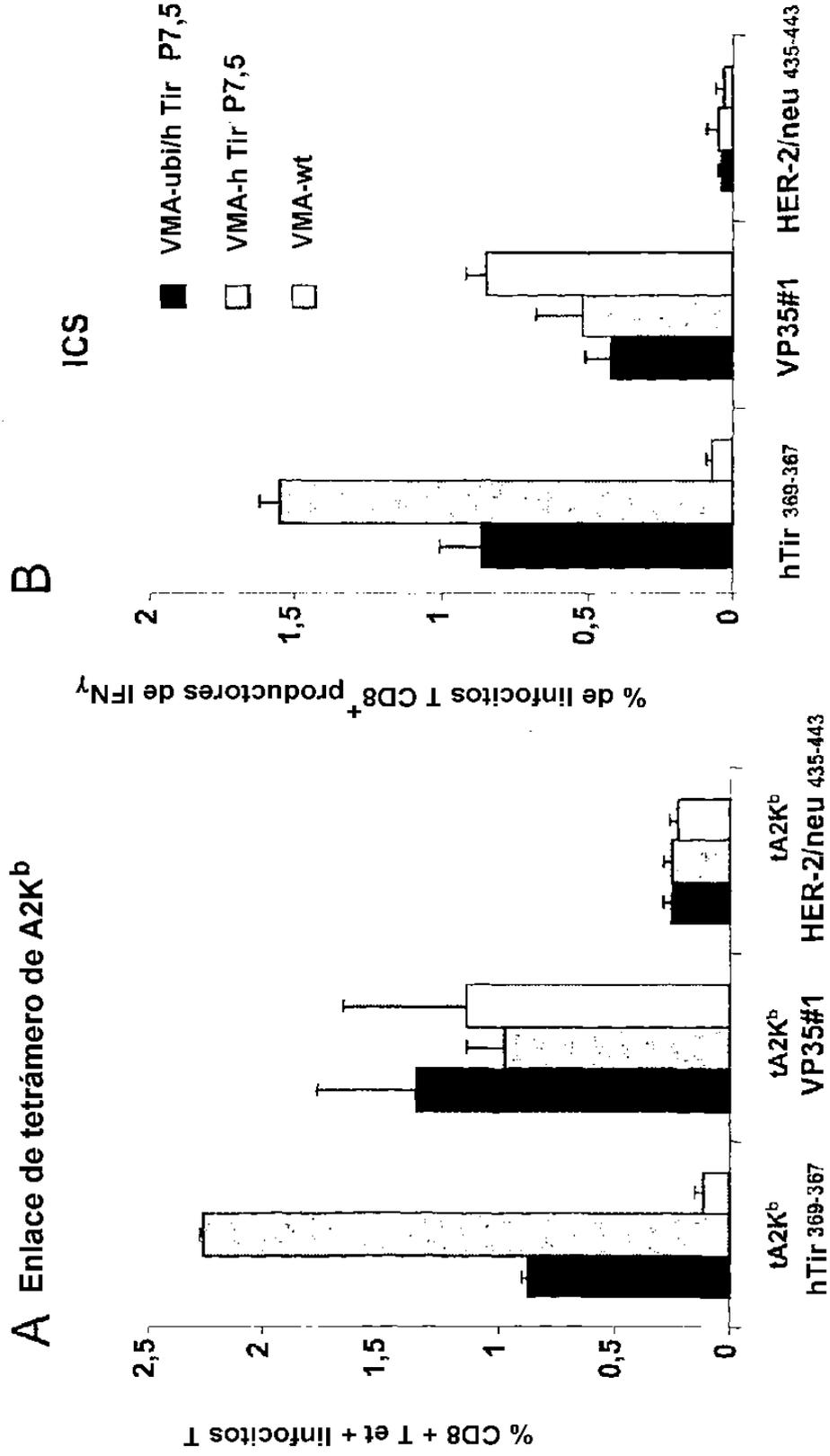


Fig. 4

Inmunogenicidad de VMA-ubi/h Tir *in vivo*: respuestas de célula T CD8+ específicas de epítope de tirosinasa restringida por HLA-A*0201 determinadas después de la vacunación de sensibilización y refuerzo con ADN/VMA de ratones A2Kb (recuerdo)

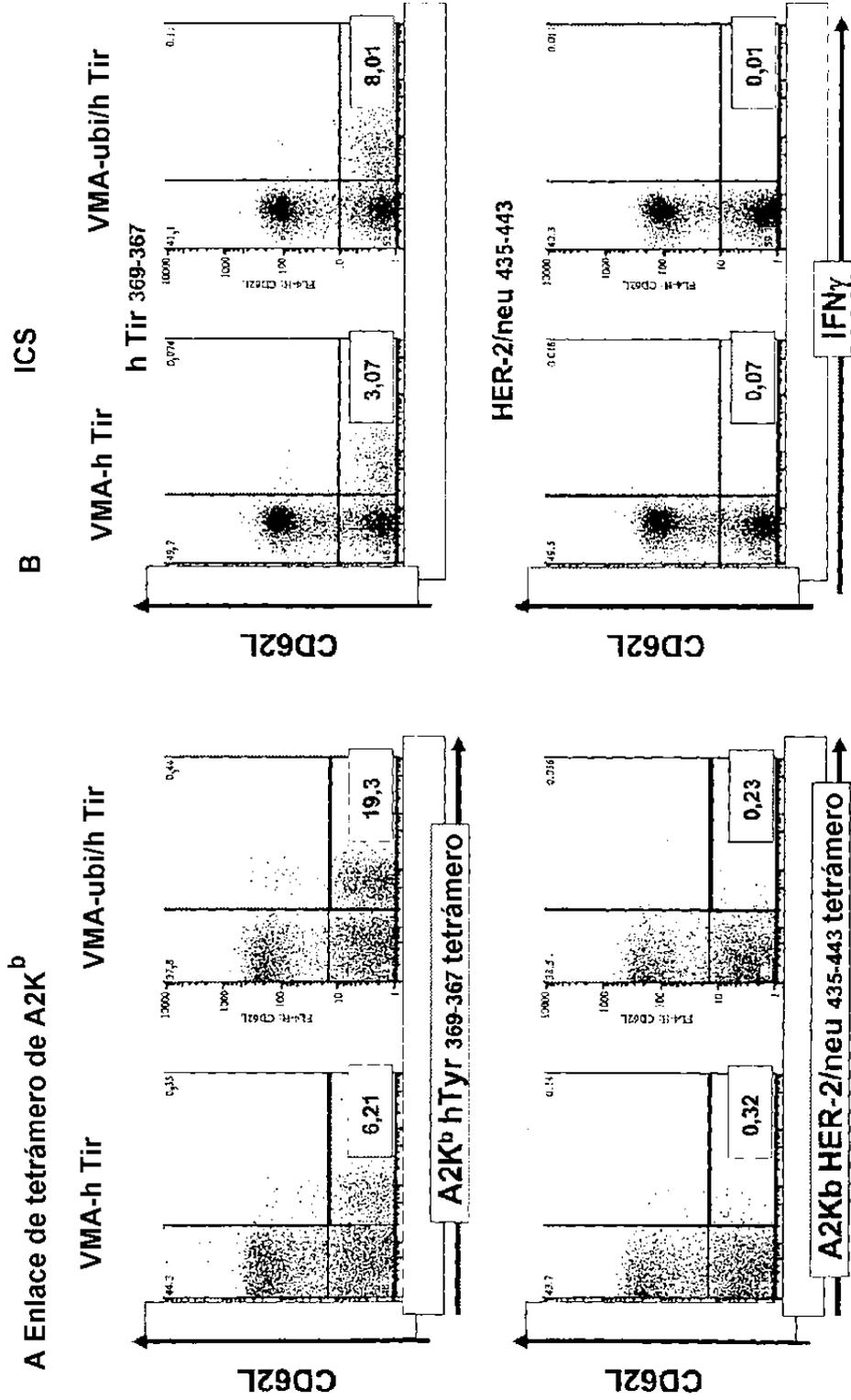


Fig. 5

Radio-inmunoprecipitación: las células RMA se infectaron con VMA-ub-hTir o VMA-hTir. Después se realizó una inmunoprecipitación de Pulso y Caza ³⁵S en los puntos temporales indicados. La semivida *in vivo* de la tirosinasa ubiquitinada se reduce significativamente.

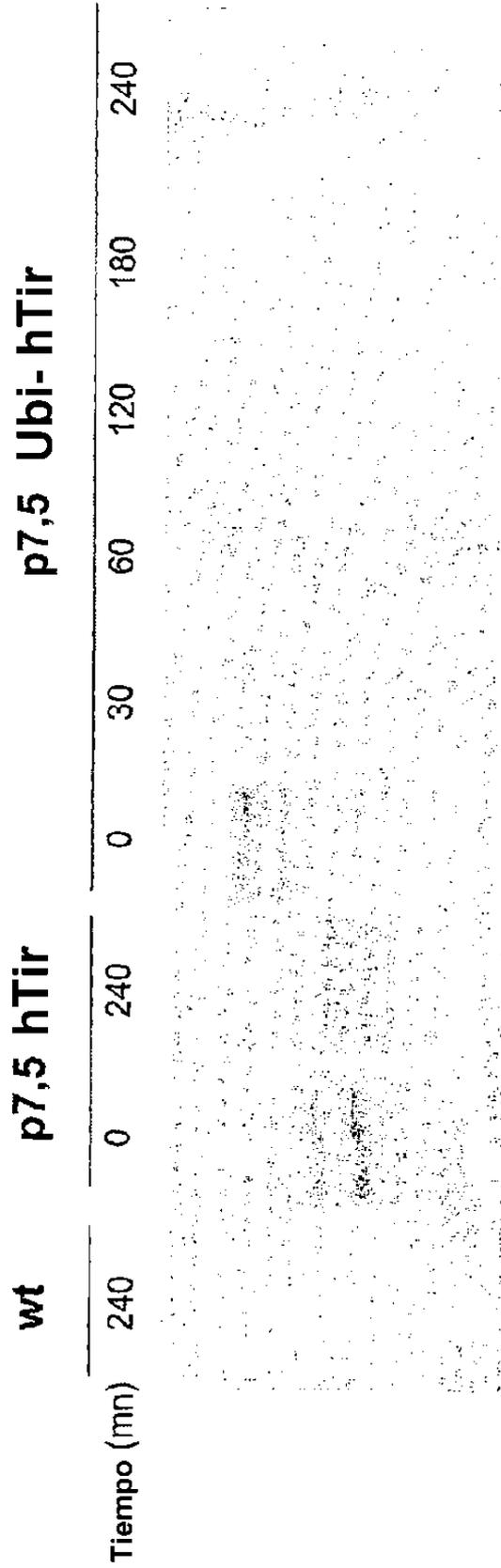


Fig. 7

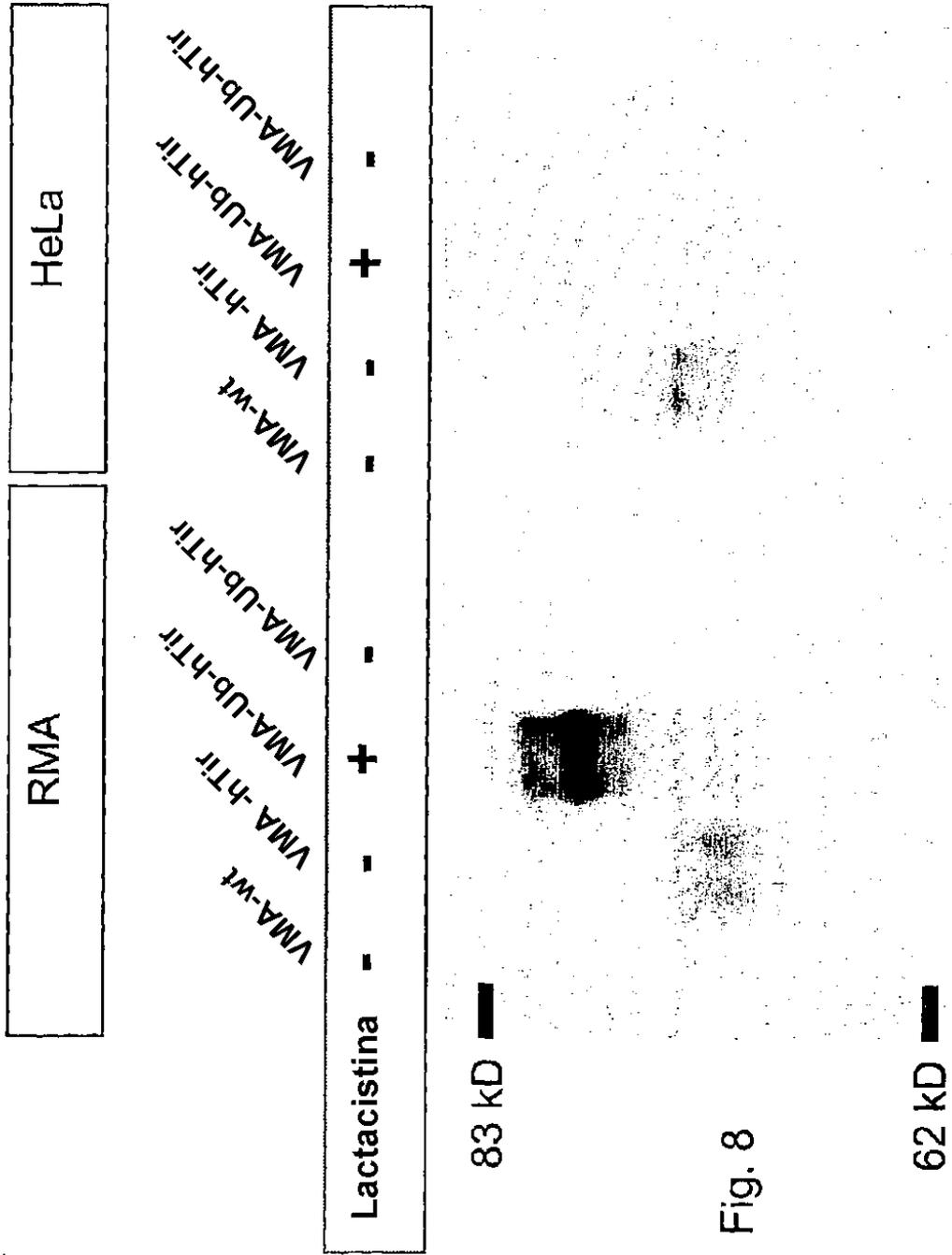


Fig. 8

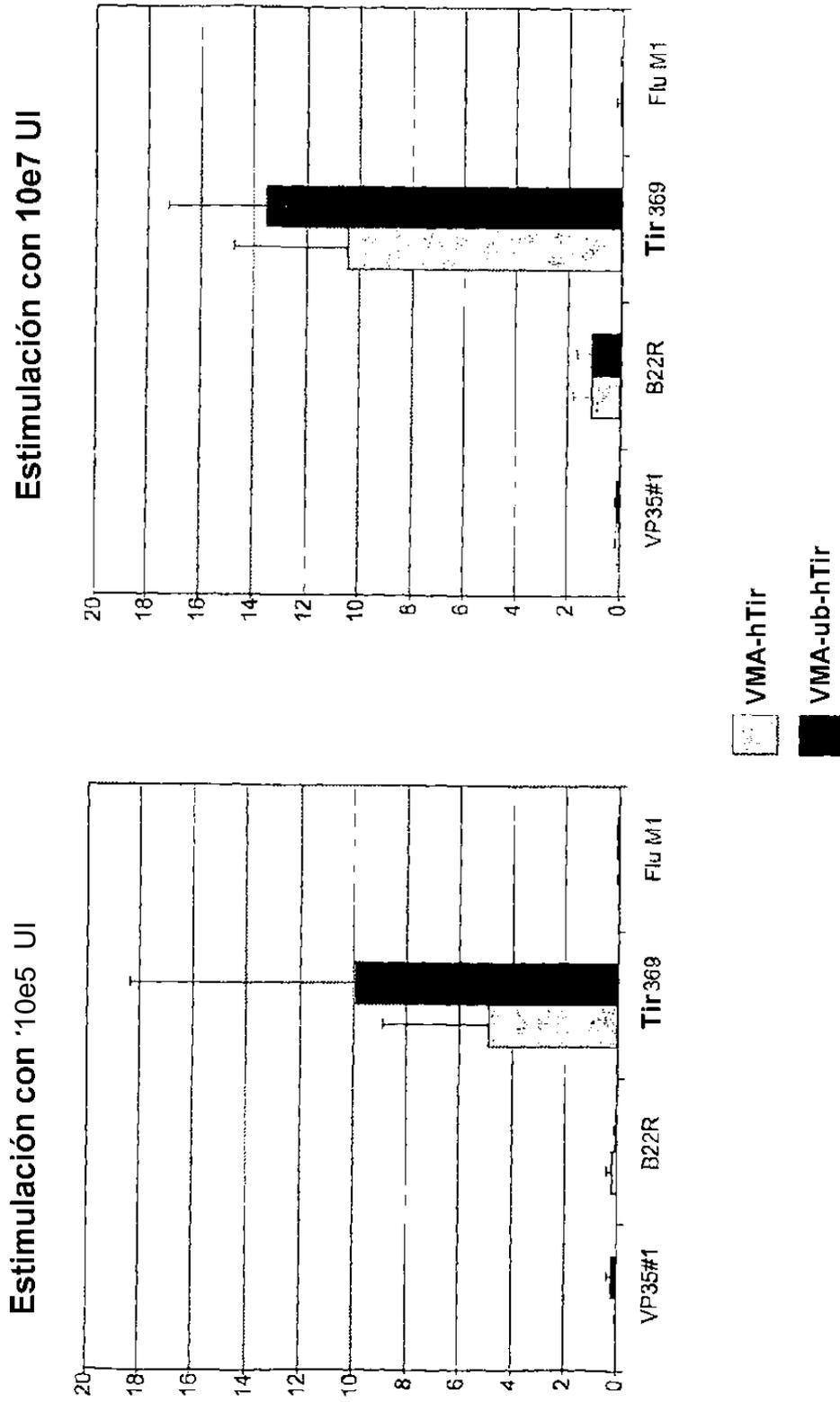


Fig. 9

Citotoxicidad *in vivo* muy eficiente de animales reforzados con VMA-Ub/hTir en comparación con VMA-hTir: los ratones HHD se estimularon con 10^6 o 10^7 UI de VMA-hTir y después se reforzaron el día 30 después de la estimulación con 10^7 UI de VMA-hTir o VMA-Ub/hTir

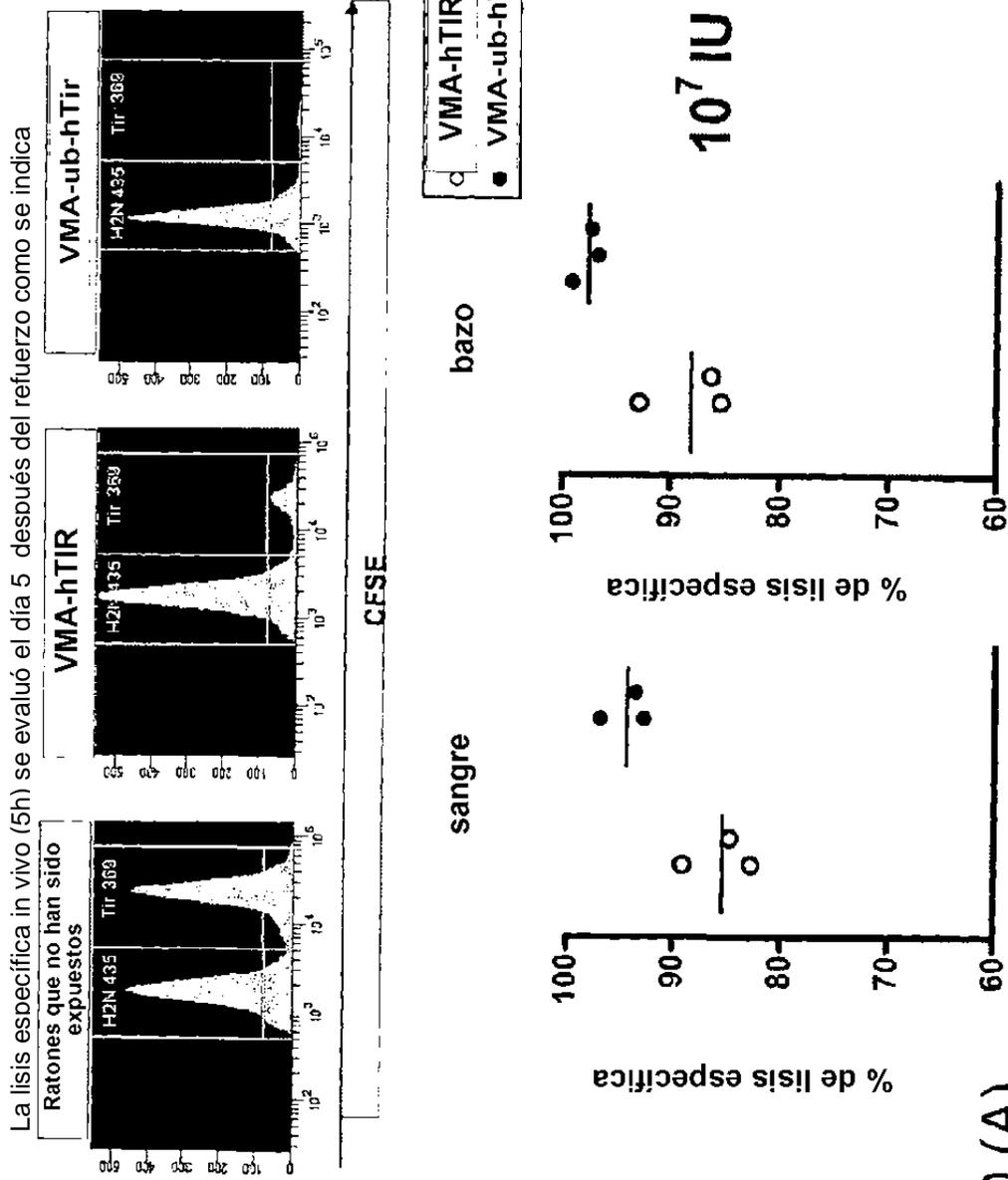


Fig. 10 (A)

Citotoxicidad *in vivo* muy eficiente de animales reforzados con VMA-ub/hTir en comparación con VMA-hTir: los ratones HDD se estimularon con 10^6 o 10^7 UI de VMA-hTir y después se reforzaron el día 30 después de la estimulación con 10^7 UI de VMA-hTir o VMA-Ub/hTir.

La lisis específica *in vivo* (5H) se evaluó el día 5 después del reforzamiento como se indica:

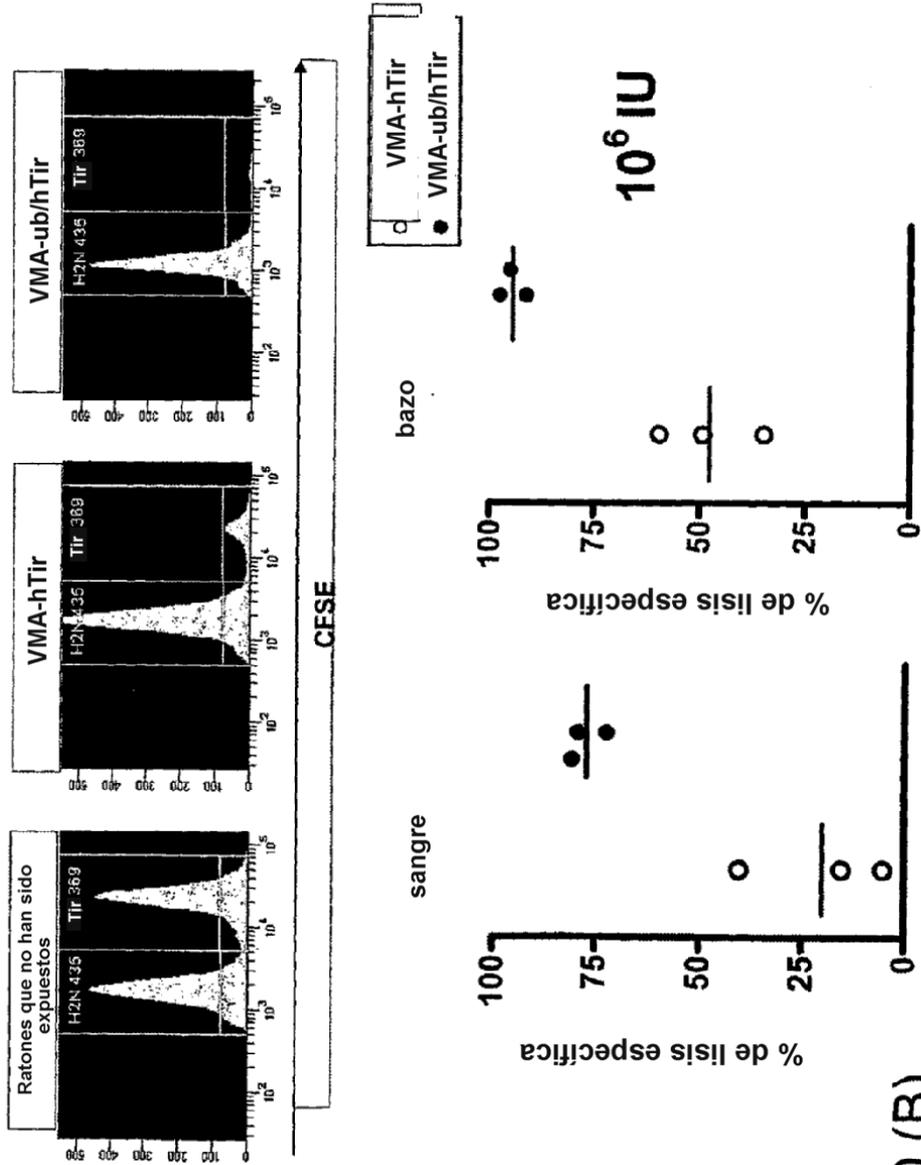


Fig. 10 (B)

Refuerzo de linfocitos T CD8+ pre-existentes con células transducidas de virus: los ratones HHd se estimularon con 10^7 UI de VMA-hTir y después se reforzaron el día 30 con 10^6 células RMA-HHde que habían sido infectadas durante 2 horas con 10 UI/célula de VMA-hTir o VMA-Ub/hTir.

La frecuencia y el número total de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno se determinó mediante tinción de citoquina intracelular

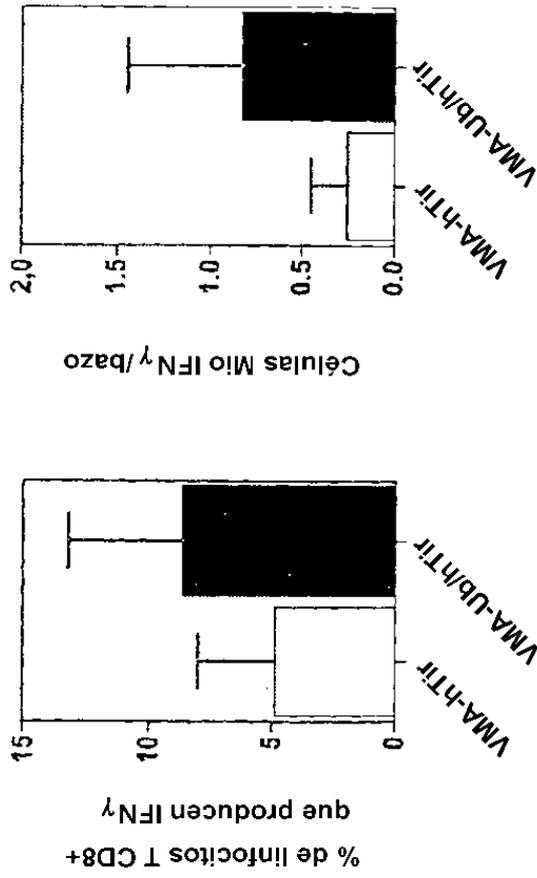


Fig. 11