

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 032**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 33/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03725536 .1**  
96 Fecha de presentación: **22.04.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1517700**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

54 Título: **Vacunas de polipéptido de fusión de mucina, composiciones y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:  
**22.04.2002 US 375095 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.07.2012**

73 Titular/es:  
**Recopharma AB  
Novum Halsovagen 7  
14157 Huddinge, SE**

72 Inventor/es:  
**HOLGERSSON, Jan**

74 Agente/Representante:  
**Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 385 032 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 de polipéptido de fusión de mucina, composiciones y métodos de uso de las mismas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones y a métodos de vacunas proteicas y a su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades tales como cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

El epítipo de hidrato de carbono  $\alpha$ -Gal ( $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Ga}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-R}$ ) se expresa en todo el reino animal, con la notable excepción de los monos, simios y seres humanos del Viejo Continente. Estas especies carecen del epítipo debido a una mutación inactivante en el gen que codifica para la  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa responsable de su biosíntesis. En los animales en los que está presente, se porta tanto por lípidos como en una variedad de proteínas transportadoras. Las especies que carecen del epítipo, por ejemplo seres humanos, tienen anticuerpos que reconocen  $\alpha$ -Gal, posiblemente como resultado de una respuesta inmunitaria contra los polisacáridos capsulares bacterianos de la microflora intestinal. Los anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal (anti-Gal) son de todas las clases y subclases de anticuerpos, y hasta el 1% de la IgG humana tiene esta especificidad.

Las mucinas tales como MUC1, y moléculas similares a mucinas con dominios altamente O-glicosilados, tales como ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1), son proteínas de alto peso molecular (> 200 kD) extensamente glicosiladas y son dianas para la  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa. Las mucinas se expresan abundantemente en células normales tales compuesto leucocitos y en muchos cánceres humanos de origen epitelial.

El documento WO98/4275 da a conocer proteínas de fusión antigénicas que portan múltiples epítipos  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  para la eliminación de anticuerpos foráneos, tales como anticuerpos humanos xenorreactivos anti-cerdo, mediante absorción.

La Temple, D.C. y Galili U. (1999) *Subcellular Biochemistry*, 32: 361 a 379 se refiere a potenciar la inmunogenicidad de vacunas contra el cáncer mediante anticuerpos anti-Gal mediante modificación mediante ingeniería genética de células tumorales para expresar epítipos  $\alpha$ -gal.

Henion, T. *et al* (1997) *Vaccine* 15: 1174 a 1182 se refiere a la síntesis de epítipos  $\alpha$ -gal en vacunas para el virus de la gripe, por  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa recombinante, con el fin de formar un complejo inmunitario con el anticuerpo anti-Gal natural.

**Sumario de la invención**

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que las proteínas sustituidas con  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  aumentan la inmunogenicidad de vacunas. Las mucinas que son las dianas para la  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa, son particularmente útiles en vacunas.

La invención presenta una vacuna purificada que incluye un polipéptido adyuvante y uno o más restos antigénicos. El polipéptido adyuvante incluye un primer polipéptido unido operativamente a un segundo polipéptido. El polipéptido adyuvante es un multímero tal como un dímero.

El primer polipéptido del polipéptido adyuvante incluye un polipéptido de mucina y se glicosila por una  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa. Un polipéptido de mucina incluye por ejemplo, PSGL-1, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5a, MUC5b, MUC5c, MUC6, MUC11, MUC12, CD34, CD43, CD45, CD96, GlyCAM-1, MAd-CAM, una región extracelular de los mismos, o un fragmento de los mismos. El primer polipéptido contiene múltiples epítipos  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$ . Preferiblemente, el primer polipéptido comprende más epítipos  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  que un polipéptido de ligando 1 de glicoproteína de P-selectina humano de tipo natural. El segundo polipéptido del polipéptido adyuvante incluye una región de un polipéptido de inmunoglobulina.

El antígeno es, por ejemplo, un virus, una bacteria o un hongo. Por ejemplo, el antígeno es hepatitis C, VIH, hepatitis B, virus del papiloma, malaria, tuberculosis, virus del herpes simple, clamidia o de la gripe, o, un componente biológico de los mismos tal como un péptido, proteína, lípido hidrato de carbono, hormona o combinación de los mismos. Alternativamente, el antígeno es un antígeno asociado a tumores tal como un antígeno asociado a tumores de mama; pulmón, colon, próstata, páncreas, cervicouterino o melanomas. El antígeno se une operativamente al polipéptido adyuvante. Por ejemplo, el antígeno se une covalentemente al antígeno.

El segundo polipéptido incluye una región de un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada, tal como una región  $F_c$  o una región  $F_{ab}$ .

65

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido adyuvante, a un vector que incluye este ácido nucleico aislado, y a una célula que comprende este vector. El vector contiene además un ácido nucleico que codifica para el polipéptido antigénico.

5 La descripción también presenta métodos de inmunización. Se inmuniza un sujeto administrando a un sujeto que lo necesita una vacuna según la invención. En un aspecto adicional, la presente descripción presenta un método de prevención o alivio de un síntoma de cáncer en un sujeto identificando un sujeto que lo necesita que padece o que corre el riesgo de desarrollar cáncer y administrando al sujeto una vacuna según la invención. Por ejemplo, el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar melanoma, cáncer de mama, pulmón, colon, próstata, páncreas, cervicouterino. Un sujeto que padece o que corre el riesgo de desarrollar cáncer se identifica mediante métodos conocidos en la técnica para el trastorno particular.

10 La descripción también presenta métodos de aumento de la secreción de anticuerpos o la activación de célula inmunitaria poniendo en contacto una célula con una vacuna según la invención. La célula es una célula B o una célula T.

15 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o la prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, predominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos sólo son ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

20 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

### 25 Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es una fotografía de una inmunotransferencia de tipo Western de proteínas PSGL-1/mIgG2b sustituidas con 1,3-gal. SDS-PAGE al seis por ciento de proteínas aisladas de sobrenadantes de células COS transfectadas con vector solo (CDM8), PSGL-1/mIgG2b o PSGL-1/mIgG2b y plásmidos de expresión de  $\alpha$ 1,3-GT porcina. Se usaron perlas de agarosa-IgG anti-ratón para la purificación por inmunoafinidad de proteínas de fusión. Tras un lavado extenso, se llevaron a ebullición las perlas en tampón de muestra en condiciones reductoras y no reductoras para liberar las proteínas absorbidas. Geles que se hicieron correr en paralelo o bien se tiñeron con plata, o bien se usaron para la transferencia electroforética de proteínas separadas sobre membranas de nitrocelulosa. Éstas se trataron con sonda posteriormente con la lectina isolectina B4 de *Bandeireia simplicifolia* conjugada con peroxidasa y se visualizaron mediante quimioluminiscencia para detectar epitopos Gala1,3Gal en proteínas inmunopurificadas. La longitud de la migración en el gel de proteínas de peso molecular de 220, 97 y 66 kDa se indica en el lado izquierdo.

40 La figura 2 es un gráfico que demuestra la cuantificación mediante ELISA de Fc de IgG anti-ratón de la concentración de la proteína de fusión de PSGL1/mIgG2b en volúmenes crecientes de sobrenadantes de células COS transfectadas antes y después de la absorción en 50  $\mu$ l de perlas de agarosa-IgG anti-ratón. Se analizaron muestras por triplicado.

45 La figura 3 es un gráfico que demuestra la citotoxicidad de células PEC-A mediada por el complemento, dependiente de anticuerpos mediante diferentes volúmenes de suero AB humano tras la absorción en 50  $\mu$ l de perlas de agarosa-IgG anti-ratón que portaban aproximadamente 300 ng de PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gal- $\alpha$ 1,3Gal o no sustituida tal como se estimó en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr.

50 La figura 4 es una fotografía de una SDS-PAGE al diez por ciento de IgG, IgM e IgA humanas purificadas por inmunoafinidad. Se hicieron correr cuatro microgramos de cada muestra en condiciones reductoras y no reductoras, y se visualizaron las proteínas mediante tinción con plata. La longitud de la migración en el gel de proteínas de peso molecular de 220, 97, 66, 46 y 30 kDa se indica en el lado izquierdo.

55 La figura 5 es un gráfico que demuestra que se investigó la citotoxicidad de células PEC-A mediada por el complemento, dependiente de anticuerpos de IgG, IgM e IgA humanas purificadas por inmunoafinidad antes y después de la absorción en PSGL1/inIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gala-1,3-Gal mediante ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr (lado derecho eje Y; % de destrucción). Se estimó la unión de células PEC-A de IgG, IgM e IgA purificadas por inmunoafinidad antes y después de la absorción en PSGL-1/mIgG2b sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal en un ELISA celular (lado izquierdo eje Y; D.O. a 405 nm). Se ejecutaron los dos ensayos en paralelo con fracciones de Ig absorbidas y no absorbidas.

60 La figura 6 es un diagrama que muestra el perfil de picos de elución de ovoalbúmina con respecto al polipéptido adyuvante de la invención.

65

Figura 7 es una fotografía de una inmunotransferencia de tipo Western que demuestra el acoplamiento del antígeno ovoalbúmina al polipéptido adyuvante de la invención.

### Descripción detallada de la invención

5

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que proteínas de fusión de mucina que tienen epítomos Gal- $\alpha$ 1,3-gal son adyuvantes eficaces.

10

15

Se ha propuesto el anticuerpo anti-Gal natural presente en seres humanos como aumentador universal de la inmunogeneidad de vacunas contra tumores autólogos (Galili, 1997, *Immunol Today* 18(6):281-5; Galili, 2001, *J Hematother Stem Cell Res.* 10(4):501-11). Los anticuerpos anti-Gal que se unen a membranas de células tumorales pueden facilitar la fagocitosis mediada por receptores del complemento y receptores de Fc de membranas de células tumorales por células presentadoras de antígeno (APC), y posteriormente activar linfocitos T citotóxicos y células T cooperadoras por estas APC. Se generarían linfocitos T citotóxicos sensibilizados contra auto-CMH complejo con péptidos derivados de antígenos asociados a tumores y estarían disponibles para la citólisis de células tumorales. La eficacia del concepto se ha verificado en un modelo tumoral de ratón en el que se usaron ratones deficientes en  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa como receptores de células de melanoma de ratón B16-B6. La vacunación de estos ratones con transfectantes estables que expresan  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa de células de melanoma B16-B6, pero no con células B16-B6 parentales que carecen del epítipo  $\alpha$ -Gal, les protege frente a una segunda exposición a células B16-B6 parentales vivas.

20

Tal como se usa en el presente documento, se suministran las siguientes definiciones con el fin de facilitar el entendimiento de este caso. En la medida en que las definiciones varíen de los significados conocidos por los expertos en la técnica, predominarán las definiciones a continuación.

25

Por "mucina" quiere decirse cualquier polipéptido con uno o más dominios O-glicosilados, que son dianas para la  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa.

30

Por "componente biológico" quiere decirse cualquier compuesto creado por o asociado con una célula, tejido, bacteria, virus, u otra entidad biológica, incluyendo péptidos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, o combinaciones de los mismos.

35

Por "compuesto adyuvante" quiere decirse cualquier compuesto que aumenta una respuesta inmunogénica o la inmunogenicidad de un antígeno o vacuna.

Por "antígeno" quiere decirse cualquier compuesto que puede inducir una respuesta inmunogénica.

40

Por "inmunoglobulina" quiere decirse un complejo de proteína o polipéptido cualquiera que se secreta por células plasmáticas y que funciona como un anticuerpo en la respuesta inmunitaria uniéndose con un antígeno específico. Inmunoglobulinas tal como se usa en el presente documento incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las regiones de inmunoglobulinas incluyen la región Fc y la región Fab, así como las inmunoglobulinas de cadena pesada o cadena ligera.

45

Por "presentación de antígenos" quiere decirse la expresión de un antígeno en la superficie de una célula en asociación con una o más moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II. La presentación de antígenos se mide mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presentación de antígenos se mide usando un ensayo celular *in vitro* tal como se describe en Gillis, *et al.*, *J. Immunol.* 120: 2027 1978.

50

Por "inmunogenicidad" quiere decirse la capacidad de una sustancia para estimular una respuesta inmunitaria. La inmunogenicidad se mide, por ejemplo, determinando la presencia de anticuerpos específicos para la sustancia. La presencia de anticuerpos se detecta mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, un ensayo ELISA.

55

Por "respuesta inmunitaria" o "respuesta inmunogénica" quiere decirse una actividad celular inducida por un antígeno, tal como producción de anticuerpos o presentación de antígenos o fragmentos de antígeno.

60

Por "degradación proteolítica" quiere decirse la degradación del polipéptido mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos. No está implicada una longitud particular por el término "péptido." La degradación proteolítica se mide, por ejemplo, usando electroforesis en gel.

La "célula" incluye cualquier célula que puede producir presentación de antígenos. Por ejemplo, la célula es una célula somática, una célula B, un macrófago o una célula dendrítica.

65

La invención proporciona proteínas de fusión de polipéptido adyuvante (denominadas en el presente documento "proteínas de fusión de mucina-Ig") que contienen un polipéptido de mucina y una región de una inmunoglobulina que son útiles en combinación con un antígeno como vacunas. Las vacunas son útiles en métodos de inmunización

en un sujeto, tal como un ser humano.

#### Vacunas

- 5 Las vacunas de la invención incluyen un polipéptido adyuvante y un antígeno. El polipéptido adyuvante es una proteína de fusión, y el antígeno es cualquier compuesto o molécula frente al que se induce una respuesta inmunitaria en un mamífero.

#### Polipéptidos adyuvantes

- 10 En diversos aspectos, la invención proporciona proteínas de fusión de adyuvante que incluyen un primer polipéptido que contiene al menos una parte de una glicoproteína, por ejemplo, un polipéptido de mucina unido operativamente a un segundo polipéptido. Por "al menos una parte" quiere decirse que el polipéptido de mucina contiene al menos un dominio de mucina (por ejemplo, un sitio de glicosilación de unión a O). Tal como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión" o "proteína quimérica" incluye al menos una parte de un polipéptido de mucina unida operativamente a un polipéptido que no es de mucina. Un "polipéptido de mucina" se refiere a un polipéptido que tiene un dominio de mucina. El polipéptido de mucina tiene uno, dos, tres, cinco, diez, veinte o más dominios de mucina. El polipéptido de mucina es cualquier glicoproteína caracterizada por una secuencia de aminoácidos sustituida con O-glicanos. Por ejemplo, un polipéptido de mucina tiene cada segundo o tercer aminoácido que es una serina o treonina. El polipéptido de mucina es una proteína secretada. Alternativamente, el polipéptido de mucina es una proteína de superficie celular.

- 25 Los dominios de mucina son ricos en los aminoácidos treonina, serina y prolina, en los que los oligosacáridos se unen mediante N-acetilgalactosamina los hidroxiaminoácidos (O-glicanos). Un dominio de mucina comprende o consiste alternativamente en un sitio de glicosilación de unión a O. Un dominio de mucina tiene 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 o más sitios de glicosilación de unión a O. Alternativamente, el dominio de mucina comprende o consiste alternativamente en un sitio de glicosilación de unión a N. Un polipéptido de mucina tiene el 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o 100% de su masa debida al glicano. Mientras que un "polipéptido que no es de mucina" se refiere a un polipéptido del que al menos una parte inferior al 40% de su masa se debe a glicanos. Un polipéptido de mucina es cualquier polipéptido codificado por un gen MUC (es decir, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5a, MUC5b, MUC5c, MUC6, MUC11, MUC12, etc.). Alternativamente, un polipéptido de mucina es ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1), CD34, CD43, CD45, CD96, Gly-CAM-1, MAdCAM, glicoforinas de glóbulos rojos, glicocalicina, glicoforina, sialoforina, leucosialina, LDL-R, ZP3 y epiglicanina. Preferiblemente, la mucina es PSGL-1.

- 35 El polipéptido de mucina contiene la totalidad o una parte de la proteína mucina. Alternativamente, la proteína mucina incluye la parte extracelular del polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido de mucina incluye la parte extracelular de PSGL-1 o una parte del mismo (por ejemplo, los aminoácidos 19-319 dados a conocer en el n.º de registro GenBank A57468). El polipéptido de mucina también incluye la parte de secuencia señal de PSGL-1 (por ejemplo, los aminoácidos 1-18), el dominio transmembrana (por ejemplo, los aminoácidos 320-343), y el dominio citoplasmático (por ejemplo, los aminoácidos 344-412).

- 45 El primer polipéptido se glicosila por una  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa. En algunos aspectos, el primer polipéptido se glicosila tanto por una  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa como una  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa, una 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, u otra enzima conocida por un experto habitual en la técnica para polipéptidos glicosilados. Las fuentes adecuadas para  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa incluyen los n.ºs de registro de GenBank AAA73558, L36150, BAB30163, AK016248, E46583 o P50127.

- 50 El primer polipéptido, y/o ácidos nucleicos que codifican para el primer polipéptido, se construye usando secuencias que codifican para mucina son conocidos en la técnica. Las fuentes adecuadas para polipéptidos de mucina y ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de mucina incluyen los n.ºs de registro de GenBank A57468, NP663625 y NM145650, CAD10625 y AJ417815, XP140694 y XM140694, XP006867 y XM006867 y NP00331777 y NM009151 respectivamente.

- 55 El resto de polipéptido de mucina se proporciona como un polipéptido de mucina variante que tiene una mutación en la secuencia de mucina que se produce de manera natural (tipo natural) que da como resultado un contenido aumentado en hidrato de carbono (con relación a la secuencia no mutada). Por ejemplo, el polipéptido de mucina variante comprendía sitios de glicosilación de unión a O adicionales en comparación con la mucina de tipo natural. Alternativamente, el polipéptido de mucina variante comprende mutaciones de la secuencia de aminoácidos que dan como resultado un número aumentado de residuos de serina, treonina o prolina en comparación con un polipéptido de mucina de tipo natural. Este contenido aumentado en hidrato de carbono se evalúa determinando la razón de proteína con respecto a hidrato de carbono de la mucina mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

- 65 El resto de polipéptido de mucina se proporciona como un polipéptido de mucina variante que tiene mutaciones en la secuencia de mucina que se produce de manera natural (tipo natural) que da como resultado una secuencia de mucina más resistente a la proteólisis (con relación a la secuencia no mutada).

El primer polipéptido incluye PSGL-1 de longitud completa. Alternativamente, el primer polipéptido comprende menos que el polipéptido de PSGL-1 de longitud completa tal como la parte extracelular de PSGL-1. Por ejemplo, el primer polipéptido tiene menos de 400 aminoácidos de longitud, por ejemplo, menos de o igual a 300, 250, 150, 100, 50 ó 25 aminoácidos de longitud. Las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de PSGL-1 incluyen el n.º de registro de GenBank: A57468; XP006867 ; XM006867 ; XP140694 y XM140694.

El segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. "Al menos una región" quiere decirse que incluye cualquier parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como la cadena ligera, cadena pesada, región FC, región Fab, región Fv o cualquier fragmento de las mismas. Se conocen en la técnica polipéptidos de fusión de inmunoglobulina y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.516.964; 5.225.538; 5.428.130; 5.514.582; 5.714.147; y 5.455.165.

El segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa. Alternativamente, el segundo polipéptido comprende menos que el polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa, por ejemplo, una cadena pesada, cadena ligera, Fab, Fab<sub>2</sub>, Fv o Fc. Preferiblemente, el segundo polipéptido incluye la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. Más preferiblemente, el segundo polipéptido incluye la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

En otro aspecto de la invención, el segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo natural. La función efectora de Fc incluye, por ejemplo, la unión a receptores de Fc, la fijación del complemento y la actividad de reducción de células T. (Véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.136.310). Se conocen en la técnica métodos de ensayo de la actividad de reducción de células T, función efectora de Fc y estabilidad de anticuerpos. En una realización, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad por el receptor de Fc. En una realización alternativa, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad por la proteína del complemento C1q.

#### Antígenos

Las vacunas de la presente invención también incluyen un antígeno. Un "antígeno" incluye cualquier compuesto frente al que se desea una respuesta inmunitaria. Un antígeno incluye cualquier sustancia que, cuando se introduce en el organismo, estimula una respuesta inmunitaria, tal como la producción de un anticuerpo a partir de una célula B, activación y expansión de células T y expresión de citocinas (por ejemplo, interleucinas). Por una "célula B" o "linfocito B" quiere decirse una célula inmunitaria que, cuando se activa, es responsable de la producción de anticuerpos. Por una "célula T" o "linfocito T" quiere decirse un miembro de una clase de linfocitos, definidos adicionalmente como células T citotóxicas y células T cooperadoras. Las células T regulan y coordinan la respuesta inmunitaria global, identificando los epítomos que marcan los antígenos, y atacando y destruyendo las células enfermas que reconocen como foráneas. Los antígenos incluyen, por ejemplo, toxinas, bacterias, células sanguíneas foráneas, y las células de órganos trasplantados. Preferiblemente, el antígeno es hepatitis C, VIH, hepatitis B, virus del papiloma, malaria, tuberculosis, virus del herpes simple, clamidia y de la gripe, o un componente biológico de los mismos, por ejemplo, un polipéptido viral o bacteriano. En realizaciones de la invención, el polipéptido adyuvante se une covalentemente al antígeno.

La vacuna incluye un polipéptido adyuvante unido operativamente a un antígeno. "Unido operativamente" pretende indicar que los polipéptidos primero y segundo del polipéptido adyuvante se unen químicamente (por ejemplo, mediante un enlace covalente tal como un enlace peptídico) de manera que permite la glicosilación de unión a O del primer polipéptido. Cuando se usa para referirse a ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido de fusión, la expresión unido operativamente significa que un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de mucina y el polipéptido que no es de mucina se fusionan en marco entre sí. El polipéptido que no es de mucina se fusiona al extremo N-terminal o extremo C-terminal del polipéptido de mucina. El antígeno se une operativamente al polipéptido adyuvante. Por ejemplo, el polipéptido adyuvante se une al antígeno mediante un enlace covalente tal como un enlace peptídico. El antígeno se fusiona al extremo N-terminal o extremo C-terminal del polipéptido de mucina. Alternativamente, el antígeno se fusiona a un aminoácido interno del polipéptido de mucina. Por "aminoácido interno" quiere decirse un aminoácido que no está en el extremo N-terminal o extremo C-terminal de un polipéptido. De manera similar, el antígeno se une operativamente al segundo polipéptido del polipéptido adyuvante, lo más normalmente mediante un enlace covalente tal como un enlace peptídico. El antígeno se fusiona al extremo N-terminal o extremo C-terminal del segundo polipéptido del polipéptido adyuvante. Alternativamente, el antígeno se fusiona a un aminoácido interno del segundo polipéptido del polipéptido adyuvante.

El polipéptido de vacuna o adyuvante se une a uno o más restos adicionales. Por ejemplo, la vacuna puede unirse adicionalmente a una proteína de fusión de GST en la que se fusionan secuencias de proteína de fusión de mucina-1g al extremo C-terminal de las secuencias de GST (es decir, glutatión-S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación del polipéptido de vacuna o adyuvante. Alternativamente, el polipéptido de vacuna o adyuvante puede unirse adicionalmente a un soporte sólido. Se conocen diversos soportes sólidos por los expertos en la técnica. Tales composiciones pueden facilitar la eliminación de anticuerpos anti-grupos sanguíneos. Por ejemplo, el polipéptido de vacuna o adyuvante se une a una partícula que se compone de, por ejemplo, compuestos metálicos, sílice, látex, material polimérico; una placa de microtitulación; nitrocelulosa, o nailon o una combinación de

los mismos.

La proteína de fusión incluye una secuencia señal heteróloga (es decir, una secuencia polipeptídica que no está presente en un polipéptido codificado por un ácido nucleico de mucina) en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia señal de mucina nativa se elimina y se sustituye por una secuencia señal de otra proteína. En determinadas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), se aumenta la expresión y/o secreción de polipéptido a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Se produce una proteína quimérica o de fusión de la invención mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, se ligan entre sí en marco fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias polipeptídicas según técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos terminales de extremos romos o de extremos en bisel para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada, y ligamiento enzimático. En otra realización, se sintetiza el gen de fusión mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, se lleva a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y volver a amplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están disponibles comercialmente muchos vectores de expresión que codifican para un resto de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Se clona un ácido nucleico que codifica para mucina en un vector de expresión de ese tipo de manera que el resto de fusión se une en marco a la proteína de inmunoglobulina.

Los polipéptidos de vacuna o polipéptidos adyuvantes pueden existir como oligómeros, tales como dímeros, trímeros o pentámeros. Preferiblemente, el polipéptido de vacuna o adyuvante es un dímero. Más preferiblemente, el polipéptido de vacuna o adyuvante es una proteína de PSGL-1 dimérico, o la región extracelular de la misma.

#### Expresión de vacunas que contienen proteína de fusión de mucina-inmunoglobulina

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica para polipéptidos de mucina, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. En diversos aspectos, el vector contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de mucina unido operativamente a un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de inmunoglobulina, o derivados, fragmentos análogos u homólogos de los mismos. Adicionalmente, el vector comprende un ácido nucleico que codifica para una  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa, o enzima similar útil para glicosilar un polipéptido, y un ácido nucleico que codifica para un antígeno. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se ligan segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se ligan segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden dar replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped con la introducción en la célula huésped, y se replican de ese modo junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma usada más comúnmente de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que van a usarse para la expresión, que se une operativamente a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés se une a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando se introduce el vector en la célula huésped).

El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por los

expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención se introducen en células huésped para producir de ese modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos de fusión mucina-Ig, formas mutantes de polipéptidos de fusión mucina-Ig, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se diseñan para la expresión de polipéptidos de fusión mucina-Ig en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, se expresan vacunas que contienen polipéptidos de fusión mucina-Ig en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus) células de levadura o células de mamífero. Se comentan adicionalmente células huésped adecuadas en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante se transcribe y se traduce *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariontas se lleva a cabo con la mayor frecuencia en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de o bien proteínas de fusión o bien no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada en el mismo, habitualmente al extremo amino-terminal de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven normalmente para tres fines: (i) aumentar la expresión de proteína recombinante; (ii) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (iii) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión de forma posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento relacionadas, incluyen factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amrann *et al.*, (1988) Gene 69:301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad afectada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico para insertarse en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los que se utilizan preferentemente en *E. coli* (véase, por ejemplo, Wada, *et al.*, 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118). Tal alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención se lleva a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

El vector de expresión de vacuna o polipéptido adyuvante es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec 1 (Baldari, *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, 1987. Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, los polipéptidos de vacuna o adyuvantes se expresan en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie de pAc (Smith, *et al.*, 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) y la serie de pVL (Lucklow y Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

Un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 187-195). Cuando se usan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan a menudo mediante elementos reguladores virales. Por ejemplo, promotores usados comúnmente se derivan de virus polio, adenovirus 2, citomegalovirus y virus del simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariontas como eucariotas véanse, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

La invención se refiere a células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula del sujeto particular sino también a la progenie o posible progenie de una célula de este tipo. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones futuras debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance del término tal como

se usa en el presente documento.

Una célula huésped es cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, las vacunas y/o polipéptidos adyuvantes se expresan en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células humanas, de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas se conocen por los expertos en la técnica.

Se introduce ADN de vector en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo precipitación conjunta con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Se encuentran métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook, *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Se introduce ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para las vacunas que contienen polipéptidos de fusión de mucina, o se introducen en un vector independiente. Se identifican las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido mediante selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las demás células morirán).

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, se usa para producir (es decir, expresar) vacunas y/o polipéptidos adyuvantes. Por consiguiente, la invención proporciona además métodos para producir vacunas y/o polipéptidos adyuvantes usando las células huésped de la invención. El método incluye cultivar la célula huésped de la invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica para vacunas y/o polipéptidos adyuvantes) en un medio adecuado de manera que se produzcan las vacunas y/o los polipéptidos adyuvantes. El método incluye además aislar vacunas y/o polipéptidos adyuvantes del medio o la célula huésped.

Las vacunas que contienen polipéptidos de fusión mucina-Ig se aíslan y se purifican según condiciones convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis o similar. Por ejemplo, las vacunas se purifican haciendo pasar una disolución a través de una columna que contiene proteína A o proteína G inmovilizadas que se unen selectivamente a la parte de Fc de la proteína de fusión. Véase, por ejemplo, Reis, K. J., *et al.*, *J. Immunol.* 132:3098-3102 (1984); publicación de solicitud PCT n.º WO87/00329. El polipéptido de fusión puede eluirse mediante tratamiento con una sal caotrópica o mediante elución con ácido acético acuoso (1 M).

Alternativamente, la vacuna y/o los polipéptidos adyuvantes según la invención se sintetizan químicamente usando métodos conocidos en la técnica. La síntesis química de polipéptidos se describe en, por ejemplo, una variedad de métodos de síntesis de proteínas son comunes en la técnica, incluyendo síntesis usando un sintetizador peptídico. Véase, por ejemplo, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Bodansky, Ed. Springer-Verlag, 1988; Merrifield, *Science* 232: 241-247 (1986); Barany, *et al.*, *Intl. J. Peptide Protein Res.* 30: 705-739 (1987); Kent, *Ann. Rev. Biochem.* 57:957-989 (1988), y Kaiser, *et al.*, *Science* 243: 187-198 (1989). Los polipéptidos se purifican de modo que estén sustancialmente libres de precursores de productos químicos u otros productos químicos usando técnicas de purificación de péptidos convencionales. La expresión "sustancialmente libres de precursores de productos químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de péptido en las que el péptido se separa de precursores de productos químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del péptido. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores de productos químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de péptido que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de precursores de productos químicos o productos químicos no peptídicos, más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de precursores de productos químicos o productos químicos no peptídicos, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de precursores de productos químicos o productos químicos no peptídicos, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de precursores de productos químicos o productos químicos no peptídicos.

La síntesis química de polipéptidos facilita la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales, incluyendo D-aminoácidos y otras moléculas orgánicas pequeñas. La sustitución de uno o más L-aminoácidos en un péptido por las correspondientes isoformas de D-aminoácido se usa para aumentar la resistencia de los péptidos a hidrólisis enzimática, y para potenciar una o más propiedades de péptidos biológicamente activos, es decir, unión a receptores, potencia funcional o duración de acción. Véase, por ejemplo, Doherty, *et al.*, 1993. *J. Med. Chem.* 36:

2585-2594; Kirby, *et al.*, 1993. J. Med. Chem. 36:3802-3808; Morita, *et al.*, 1994. FEBS Lett. 353: 84-88; Wang, *et al.*, 1993. Int. J. Pept. Protein Res. 42: 392-399; Fauchere y Thiunieu, 1992. Adv. Drug Res. 23: 127-159.

La introducción de reticulaciones covalentes en una secuencia peptídica puede restringir conformacional y topográficamente la estructura principal del polipéptido. Esta estrategia se usa para desarrollar análogos peptídicos de los polipéptidos de fusión con aumento de potencia, selectividad y estabilidad. Dado que la entropía conformacional de un péptido cíclico es menor que la de su equivalente lineal, la adopción de una conformación específica puede producirse con una menor disminución en la entropía para un análogo que para un análogo acíclico, haciendo de ese modo que la energía libre para la unión sea más favorable. Se logra a menudo la macrociclación formando un enlace amida entre los extremos N-terminal y C-terminal del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N-terminal o C-terminal [por ejemplo, con  $K_3Fe(CN)_6$  a pH 8,5] (Samson *et al.*, Endocrinology, 137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, DeGrado, Adv Protein Chem, 39: 51-124 (1988). También se introducen puentes disulfuro en secuencias lineales para reducir su flexibilidad. Véase, por ejemplo, Rose, *et al.*, Adv Protein Chem, 37: 1-109 (1985); Mosberg *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 106: 505-512 (1982). Además, la sustitución de residuos de cisteína por penicilamina (Pen, 3-mercapto-(D)valina) se ha usado para aumentar la selectividad de algunas interacciones de los receptores de opioides. Lipkowski y Carr, Peptides: Synthesis, Structures, and Applications, Gutte, ed., Academic Press págs. 287-320 (1995).

## 20 Composiciones farmacéuticas

Las vacunas y péptidos de fusión y ácidos nucleicos de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las sustancias anteriores, un excipiente, portador, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo vías oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal o en parche.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden ser en comprimido, cápsula, polvo o forma líquida. Un comprimido puede incluir un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También pueden incluirse solución salina fisiológica, disolución de dextrosa u otros sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de la afectación, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la técnica podrán preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato, conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos pueden incluirse, según se requiera.

Ya sea una molécula de polipéptido, péptido o ácido nucleico, otro compuesto farmacéuticamente útil según la presente invención que va a administrarse a un individuo, la administración es preferiblemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (como puede ser el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y el transcurso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que esté tratándose. La prescripción de tratamiento, por ejemplo decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos de cabecera y otros médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno que va a tratarse, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y los protocolos mencionados anteriormente en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16ª edición, Osol, A. (ed), 1980.

Alternativamente, pueden usarse terapias de direccionamiento para suministrar el agente activo más específicamente a determinados tipos de célula, mediante el uso de sistemas de direccionamiento tales como ligandos específicos de células o anticuerpos. El direccionamiento puede ser deseable por una variedad de motivos; por ejemplo si el agente es inaceptablemente tóxico, o si se requiriese si no una dosificación demasiado alta, o si no se pudiese entrar de otro modo en las células diana.

En lugar de administrar estos agentes directamente, podrían producirse en las células diana mediante la expresión a partir de un gen que los codifica introducido en las células, por ejemplo en un vector viral (una variante de la técnica VDEPT, véase a continuación). El vector podría direccionarse hasta las células específicas que han de tratarse, o podría contener elementos reguladores, que se activan de manera más o menos selectiva por las células diana.

Alternativamente, el agente podría administrarse en una forma precursora, para conversión en la forma activa por un agente activante producido en, o direccionado hasta, las células que van a tratarse. Este tipo de enfoque se conoce a veces como ADEPT o VDEPT; implicando el primero el direccionamiento del agente activante hasta las células

mediante conjugación a un anticuerpo específico de la célula, mientras que el último implica producir el agente activante, por ejemplo una vacuna o proteína de fusión, en un vector mediante expresión a partir de un ADN que lo codifica en un vector viral (véanse por ejemplo, los documentos EP-A-415731 y WO 90/07936).

5 En una realización específica de la presente invención, los ácidos nucleicos incluyen una secuencia que codifica para una vacuna, o derivados funcionales de la misma, se administran para modular la activación de célula inmunitaria por medio de terapia génica. En realizaciones más específicas, un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican para una vacuna o proteína de fusión, o derivados funcionales de los mismos, se administran por medio de  
10 terapia génica. La terapia génica se refiere a terapia que se realiza mediante la administración de un ácido nucleico específico a un sujeto. En esta realización de la presente invención, el ácido nucleico produce su(s) péptido(s) codificado(s), que sirve(n) entonces para ejercer un efecto terapéutico modulando la función de la enfermedad o el trastorno. Puede usarse cualquiera de las metodologías relativas a terapia génica disponibles en la técnica, en la práctica de la presente invención. Véase por ejemplo, Goldspiel, *et al.*, 1993. Clin Pharm 12: 488-505.

15 En una realización preferida, el agente terapéutico comprende un ácido nucleico que es parte de un vector de expresión que expresa una cualquiera o más de las vacunas, proteínas de fusión, o fragmentos, derivados o análogos de las mismas, dentro de un huésped adecuado. En una realización específica, un ácido nucleico de este tipo presenta un promotor que se une operativamente a una región/regiones codificante(s) de una proteína de fusión. El promotor puede ser inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización específica,  
20 se usa una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes (y cualquier otra secuencia deseada) están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado dentro del genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de ácidos nucleicos. Véase por ejemplo, Koller y Smithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8932-8935.

25 El suministro del ácido nucleico terapéutico en un paciente puede ser o bien directo (es decir, el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vector que contiene ácido nucleico) o bien indirecto (es decir, en primer lugar se transforman células con el ácido nucleico *in vitro*, luego se trasplantan al paciente). Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. En una realización específica, se administra directamente un ácido nucleico *in vivo*, expresándose para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera  
30 de numerosos métodos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, construir el ácido nucleico como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrar el mismo de manera que se vuelva intracelular (por ejemplo, mediante infección usando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral; véase la patente estadounidense n.º 4.980.286); inyectar directamente ADN desnudo; usar bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un "Gene Gun"<sup>®</sup>; Biolistic, Du-Pont); recubrir los ácidos nucleicos con lípidos; usar agentes de transfección/receptores de superficie celular asociados; encapsular en liposomas, micropartículas o microcápsulas;  
35 administrar en ligamiento a un péptido que se sabe que entra en el núcleo; o administrarlo en ligamiento a un ligando predispuesto a la endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987. J Biol Chem 262: 4429-4432), que puede usarse para "seleccionar como diana" tipos celulares que expresan específicamente el receptores de interés, etc.

40 Un enfoque adicional para terapia génica en la práctica de la presente invención implica transferir un gen a células en cultivo tisular *in vitro* mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, infección viral, o similar. Generalmente, el método de transferencia incluye la transferencia concomitante de un marcador seleccionable a las células. Las células se ponen entonces bajo presión de selección (por ejemplo,  
45 resistencia a antibióticos) de modo que se facilite el aislamiento de esas células que se han captado, y están expresando, el gen transferido. Las células se suministran entonces a un paciente. En una realización específica, antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante, el ácido nucleico se introduce en una célula mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico de interés, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por  
50 microcélulas, fusión de esferoplastos, y metodologías similares que garantizan que no se perturban las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras por la transferencia. Véase por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993. Meth Enzymol 217: 599-618. La técnica elegida debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico pueda expresarse por la célula. Preferiblemente, el ácido nucleico transferido es heredable y puede expresarse por la progenie de la célula.

55 En realizaciones preferidas, las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, inyección de células epiteliales (por ejemplo, por vía subcutánea), aplicación de células de la piel recombinantes como un injerto de piel en el paciente, e inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células progenitoras o madre hematopoyéticas). La cantidad total de células que se prevén para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, y similares, y puede determinarse por un experto en la técnica.

60 Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para fines de terapia génica engloban cualquier tipo de célula disponible, deseado, y pueden ser xenogénicas, heterogénicas, singénicas o autogénicas. Los tipos celulares incluyen, pero no se limitan a, células diferenciadas tales como células epiteliales, células endoteliales,

queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos y células sanguíneas, o diversas células progenitoras o madre, en particular células del músculo cardiaco embrionarias, células madre hepáticas (publicación de patente internacional WO 94/08598), células madre neurales (Stemple y Anderson, 1992, Cell 71: 973-985), células progenitoras o madre hematopoyéticas, por ejemplo, tal como se obtienen a partir de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, y similares. En una realización preferida, las células utilizadas para terapia génica son autólogas para el paciente.

Las vacunas de la presente invención también incluyen uno o más compuestos adyuvantes. Los compuestos adyuvantes son útiles porque potencian la liberación a largo plazo de la vacuna funcionando como un depósito. La exposición a largo plazo a la vacuna debe aumentar la duración de tiempo en que se presenta al sistema inmunitario el antígeno para su procesamiento así como la duración de la respuesta de anticuerpos. El compuesto adyuvante también interacciona con células inmunitarias, por ejemplo, estimulando o modulando células inmunitarias. Además, el compuesto adyuvante potencia la fagocitosis de los macrófagos tras unir la vacuna como un material particulado (una función de portador / vehículo).

Los compuestos adyuvantes útiles en la presente invención incluyen adyuvante completo de Freund (CFA); adyuvante incompleto de Freund (IFA); Montanide ISA (adyuvante incompleto de Seppic); sistema adyuvante Ribi (RAS); TiterMax; formulación adyuvante Syntex (SAF); adyuvantes de sales de aluminio; antígeno adsorbido en nitrocelulosa; antígenos encapsulados o atrapados; complejos inmunoestimulantes (ISCOM); y adyuvante Gerbu<sup>R</sup>.

#### Métodos de inmunización

Las vacunas de la presente invención tienen propiedades inmunoprotectoras e inmunoterapéuticas superiores con respecto a otra vacuna que carece de polipéptidos adyuvantes. Las vacunas que contienen proteína de fusión de mucina-Ig tienen una inmunogenicidad, seguridad, tolerancia y eficacia potenciadas. Por ejemplo, la inmunogenicidad potenciada de la vacuna de la presente invención puede ser mayor que vacunas que no contienen polipéptido adyuvante comparativas en 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más, tal como se mide mediante la estimulación de una respuesta inmunitaria tal como producción y/o secreción de anticuerpos, activación y expansión de células T y expresión de citocinas (por ejemplo, producción de interleucinas).

La superficie celular de células cancerosas contiene a menudo epítopos específicos de hidratos de carbono, polipéptidos y otros posibles anticuerpos que no están presentes en la superficie de células no cancerosas. Esta disparidad antigénica permite que el sistema inmunitario del organismo detecte y responda a células cancerosas. Se han asociado los polipéptidos de mucina con numerosos cánceres. Por ejemplo, se ha asociado PSGL-1 con cánceres, incluyendo cáncer de pulmón y leucemia mieloide aguda (Véase Kappelmayer *et al.*, Br J Haematol. 2001, 115(4):903-9). Además, se han detectado anticuerpos específicos de MUC1 en sueros de pacientes con cáncer de mama, páncreas y colon. Está claro que pueden reconocerse las mucinas por el sistema inmunitario humano; por tanto, se inducirá inmunidad frente a células tumorales que expresan antígenos específicos mediante vacunas que contienen proteínas de fusión de mucina-Ig y un antígeno específico de células tumorales. La inmunidad frente a células tumorales se mide mediante el grado de disminución del tamaño tumoral, disminución de la vascularización tumoral, aumento de la supervivencia del sujeto o aumento de la apoptosis de células tumorales.

Se da a conocer en el presente documento un método de inmunización de un sujeto. Se inmuniza un sujeto mediante la administración al sujeto de la vacuna que incluye un polipéptido adyuvante y un antígeno. El sujeto corre el riesgo de desarrollar o padecer una infección, por ejemplo, bacteriana, viral o fúngica. Las infecciones incluyen, hepatitis C, VIH, hepatitis B, virus del papiloma, malaria, tuberculosis, virus del herpes simple, clamidia o de la gripe. Alternativamente, corre el riesgo de desarrollar o padecer cáncer. El cáncer es por ejemplo cáncer de mama, pulmón, colon, próstata, páncreas, cervicouterino o melanoma.

Los métodos descritos en el presente documento conducen a una reducción en la gravedad o al alivio de uno o más síntomas de una infección o cáncer. La infección y los cánceres se diagnosticaron o monitorizaron, normalmente por un médico usando metodologías convencionales. Se identifica un sujeto que requiere inmunización mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se inmunizan sujetos tal como se expone en la Recomendación General sobre Inmunización del CDC (51(RR02) págs. 1-36). Se diagnostica cáncer, por ejemplo, mediante exploración física, biopsia, análisis de sangre o radiografía.

El sujeto es por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo. El tratamiento se administra antes del diagnóstico del trastorno. Alternativamente, el tratamiento se administra después del diagnóstico.

Se determina la eficacia del tratamiento en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el trastorno particular. El alivio de uno o más síntomas del trastorno indica que el compuesto confiere un beneficio clínico. Por "eficaz" quiere decirse que el tratamiento conduce a una disminución en el tamaño, la prevalencia o el potencial metastásico del cáncer en un sujeto. Cuando se aplica el tratamiento profilácticamente, "eficaz" significa que el tratamiento retarda o previene que se forme un tumor o retarda, previene o alivia un síntoma del cáncer. Se

realiza la evaluación del cáncer usando protocolos clínicos convencionales. De manera similar, se determina un aumento del beneficio clínico de la inmunización, por ejemplo, mediante la disminución de las visitas al médico, y la disminución de la carga de enfermedad en la comunidad.

5 Métodos de aumento de la secreción de anticuerpos

Se da a conocer en el presente documento un método de aumento o estimulación de la producción y/o secreción de anticuerpos en una célula. La célula es una célula formadora de anticuerpos tal como una célula B. Alternativamente, la célula es una célula que aumenta la producción de anticuerpos por una célula B tal como una célula T (Th y Tc), macrófago, célula dendrítica.

La secreción de anticuerpos por una célula se aumenta poniendo en contacto la célula con la vacuna que incluye un polipéptido adyuvante y un antígeno. La secreción de anticuerpos por una célula puede aumentarse directamente, tal como estimulando células B, o indirectamente, tal como estimulando células T (por ejemplo, células T cooperadoras), células T activadas que estimulan entonces células B. El aumento de la producción y/o secreción de anticuerpos se mide mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo ELISA, la reacción de precipitina y reacciones de aglutinación.

20 Métodos de aumento de la activación de célula inmunitaria

La invención proporciona un método de activación o estimulación de una célula inmunitaria (por ejemplo, una célula B o una célula T). La activación de células T se define por un aumento en el GMPc intracelular mediado por calcio, o un aumento en los receptores de superficie celular para IL-2. Por ejemplo, un aumento en la activación de células T se caracteriza por un aumento del GMPc intracelular mediado por calcio y o receptores de IL-2 tras poner en contacto la célula T con la vacuna, en comparación con la ausencia de la vacuna. El GMPc intracelular se mide, por ejemplo, mediante un inmunoensayo competitivo o ensayo de proximidad de centelleo usando kits de prueba disponibles comercialmente. Los receptores de IL-2 de la superficie celular se miden, por ejemplo, determinando la unión a un anticuerpo contra receptores de IL-2 tal como el anticuerpo PC61. La activación de célula inmunitaria también puede determinarse midiendo la actividad proliferativa de células B, producción de inmunoglobulinas (Ig) policlonales y formación de anticuerpos específicos de antígeno mediante métodos conocidos en la técnica.

La invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos.

35 **Ejemplo 1: Producción de polipéptidos adyuvantes**

Construcción de vectores de expresión.

Se amplificó por PCR  $\alpha$ 1,3-GT porcina a partir de un ADNc de bazo de cerdo usando un cebador directo que tenía seis codones de complementariedad con el extremo 5' de la secuencia codificante, una secuencia consenso de inicio de la traducción Kozak y un sitio de restricción Hind3, y un cebador inverso con seis codones de complementariedad con el extremo 3' de la secuencia codificante, una terminación de la traducción y un sitio de restricción Not I. Se clonó el ADNc de  $\alpha$ 1,3-GT amplificado en el polilicador de CDM8 usando Hind3 y Not 1. Se obtuvo la secuencia codificante del ligando 1 de glicoproteína de P-selectina mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc de HL-60, se clonó en CDM8 con Hind3 y Not I, y se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se construyó el plásmido de expresión de mucina/inmunoglobulina mediante ligamiento del ADNc amplificado por PCR de la parte extracelular de PSGL-1 en marco mediante un sitio BamH I, a la parte de Fc (región bisagra, CH2 y CH3) de IgG2b de ratón portada como un casete de expresión en CDM7.

50 Transfecciones y producción de quimeras de PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> secretadas

Se preparó el cóctel de transfección mezclando 39  $\mu$ l de glucosa al 20%, 39  $\mu$ g de ADN de plásmido, 127  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O y 15,2  $\mu$ l de polietilimina 0,1 M (25 kDa; Aldrich, Milwaukee, WI) en tubos de poliestireno de 5 ml. En todas las mezclas de transfección, se usaron 13  $\mu$ g del plásmido PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub>. Se añadieron trece microgramos del plásmido para las diferentes glicosiltransferasas, y, cuando fue necesario, se añadió el plásmido CDM8 hasta alcanzar un total de 39  $\mu$ g de ADN de plásmido. Se dejaron las mezclas a temperatura ambiente durante 10 min. antes de añadirse en 10 ml de medio de cultivo a las células, a una confluencia de aproximadamente el 70%. Después de 7 días, se recogieron los sobrenadantes celulares, se centrifugaron los residuos (1400 x g, 15 mm) y se añadió NaN<sub>3</sub> a una concentración final concentración del 0,02% (p/v).

60 Purificación de PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> secretada, para análisis mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western

Se purificaron proteínas de fusión PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> a partir de los sobrenadantes recogidos en 50  $\mu$ l de perlas de agarosa-anti-mlgG de cabra (suspensión 100:1; Sigma) mediante volteo de un extremo a otro durante la noche a 4°C. Se lavaron las perlas con proteínas de fusión tres veces con PBS y se usaron para el análisis posterior.

Normalmente, se disolvió la muestra en 50  $\mu$ l de tampón de muestra reductor 2x y se cargó 10:1 de muestra en cada pocillo.

#### Tratamiento con PNGasa F de PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> purificada por afinidad

Se usó un kilt de PNGasa F (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) para la desglicosilación de N-glicano. Se usó una ligera modificación del protocolo proporcionado por el fabricante. En tubos Eppendorf de 1,5 ml, se mezclaron 20  $\mu$ l de tampón de reacción con PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> purificada en perlas de agarosa y se llevó a ebullición durante 3 min. Se centrifugó la mezcla, y se transfirieron 10  $\mu$ l del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. Se añadieron diez microlitros de PNGasa F o, como control negativo, 10  $\mu$ l de tampón de reacción. Se incubaron los tubos durante 1,5 h a 37°C. Tras la incubación, se añadieron 20  $\mu$ l de tampón de muestra reductor 2x y 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, y se llevaron a ebullición las muestras durante 3 min.

#### ELISA para la determinación de la concentración de PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> en sobrenadantes

Se recubrieron placas para ELISA de noventa y seis pocillos (Costar 3590, Corning, NY) con 0,5  $\mu$ g/pocillo de anticuerpos específicos anti-mIgG de cabra purificados por afinidad (Sigma) en 50  $\mu$ l de tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, durante dos h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo durante la noche a 4°C con 300  $\mu$ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS con Tween al 0,05% (PBS-T) y posterior lavado, se añadieron 50  $\mu$ l de sobrenadante de la muestra, se diluyeron en serie con medio de cultivo. Tras el lavado, se incubaron las placas durante 2 h con 50  $\mu$ l de anti-mIgM de cabra-HRP (Sigma), se diluyó 1:10.000 con tampón de bloqueo. Para la disolución de desarrollo, se disolvió un comprimido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma) en 11 ml de tampón citrato/fosfato 0,05 M con 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (p/v). Se añadieron cien microlitros de disolución de desarrollo. Se detuvo la reacción con 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se leyeron las placas a 450 y 540 nm en un lector automático de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Como patrón, se usó por triplicado una serie de dilución de fragmentos de mIgG Fe purificados (Sigma) en medio de cultivo.

#### SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western

Se ejecutó la SDS-PAGE mediante el método de Laemmli (1970) Nature 227 (5259) : 680-685 con un gel acumulador al 5% y un gel de resolución al 8%, y las proteínas separadas de manera electroforética se sometieron a inmunotransferencia sobre membranas Hybond™-C extra tal como se describió anteriormente (Liu *et al.*, 1997) Transplantation, 63 : 1673-1682. Tras el bloqueo durante la noche en solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05% (TBS-T) con BSA al 3%, se lavaron las membranas tres veces con TBS-T. Se incubaron entonces durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo de ratón anti-grupo sanguíneo A humano de todos los tipos (mIgM, Dako, Carpinteria, CA) o anticuerpo anti-H tipo 1 humano (mIgG<sub>3</sub>, Signet; Dedham, MA), H tipo 2 (mIgM, Dako) o H tipo 3 (mIgM, hibridoma HH14, ATCC HB9299). Se diluyeron todos los anticuerpos 1:200 con BSA al 3% en TBS-T, excepto por el anticuerpo contra H tipo 3, que se diluyó hasta una concentración de 1  $\mu$ g/ml con BSA al 3% en TBS-T. Se lavaron las membranas tres veces con TBS-T antes de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa del rábano (HRP), anti-mIgM de cabra (Cappel, Durham, NC) o anti-mIgG3 de cabra (Serotec, Oxford, England) diluidos 1:2000 con BSA al 3% en TBS-T. Se visualizaron los anticuerpos secundarios unidos mediante quimioluminiscencia usando el kit de ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Para la detección de la propia PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub>, se usó anti-mIgG de cabra marcado con HRP (Sigma) a una dilución de 1:10.000 en BSA al 3% en TBS-T tal como se describe, pero sin incubación con un anticuerpo secundario.

#### Purificación de IgG, IgM e IgA humanas.

Se purificaron IgG, IgM e IgA humanas a partir de suero AB humano reunido a partir de más de 20 donantes de sangre sanos usando perlas de agarosa-anticuerpo de cabra anti-IgG humana (específico de Fc; A-3316, Sigma), IgM (específico de cadena  $\mu$ ; A-9935, Sigma) e IgA (específico de cadena  $\alpha$ ; A-269 1, Sigma). Brevemente, se vertieron 5 ml de suspensión (2,5 ml de perlas empaquetadas) en una columna (10 mm de diámetro) y se lavaron con PBS. Se aplicaron diez mililitros de suero AB reunido humano a 1 ml/minuto usando una bomba peristáltica, se lavaron con varios volúmenes de columna de PBS, y se eluyeron con glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 2,4 usando una velocidad de flujo de 1 ml/minuto. Se recogieron fracciones de un mililitro en tubos que contenían 0,7 ml de tampón de neutralización (Tris 0,2 M/HCl, pH 9). Se leyó la absorción a 280 nm de manera espectrofotométrica y se reunieron los tubos que contenían proteína, se dializaron frente a PBS al 1%, y se liofilizaron. Se resuspendieron las inmunoglobulinas liofilizadas en agua destilada y se ajustaron las concentraciones a 16 mg/ml para IgG, 4 mg/ml para IgA y 2 mg/ml para IgM.

Expresión y caracterización de la proteína de fusión PSGL1/m1qG2b. Se recogieron los sobrenadantes de células COS-7 m6 transfectadas con el plásmido vector CDM8, el plásmido PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub>, o PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> junto con el plásmido  $\alpha$ 1,3-GT porcino, aproximadamente siete días tras la transfección. Se purificaron las proteínas de fusión de mucina/Ig mediante absorción en perlas de agarosa-IgG anti-ratón y se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western usando la isolectina B4 de *Bandeireia simplicifolia* (BSA 1134) para la

detección. Tal como se observa en la figura 1, la proteína de fusión migró en condiciones reductoras como una banda ancha con peso molecular aparente de 145 kDa que se tiñó de manera relativamente escasa con plata. La heterogeneidad en el tamaño, aproximadamente de 125 a 165 kDa, y la escasa capacidad de tinte está de acuerdo con las observaciones previas con respecto al comportamiento de proteínas de tipo mucina, altamente glicosiladas. La proteína de fusión se produce lo más probablemente como un homodímero porque la SDS-PAGE en condiciones no reductoras reveló una doble banda de un peso molecular aparente de más de 250 kDa. Las cantidades de proteína de fusión purificada por afinidad procedente de los dos sobrenadantes derivados del mismo número de células COS transfectadas con el plásmido PSGL-1/mIgG2b solo o junto con el plásmido  $\alpha$ 1,3-GT, respectivamente, fueron similares. El tratamiento con sonda de las membranas sometidas a electrotransferencia con BSA 1134 reveló una fuerte tinción de la proteína de fusión obtenida tras la cotransfección con la  $\alpha$ 1,3-GT porcina (figura 1). La proteína de fusión PSGL-1/mIgG2b producida en células COS-7 m6 sin cotransfección del ADNc de  $\alpha$ 1,3-GT también mostró una débil tinción con la lectina BSA 1134, a pesar del hecho de que las células COS se derivan de mono simiesco, un mono del Viejo Continente que carece de actividad  $\alpha$ 1,3-GT. Esto indica que la lectina BSA 1134 tiene una especificidad ligeramente más amplia que sólo los epítomos Gal  $\alpha$ 1,3Gal. No obstante, la cotransfección del ADNc de  $\alpha$ 1,3-GT porcina soportó la expresión de una proteína de fusión PSGL-1/mIgG2b altamente sustituida con Gal  $\alpha$ 1,3Gal.

Para la cuantificación de quimeras de PSGL-1/mIgG2b en sobrenadantes de células COS transfectadas, y en perlas de agarosa-IgG de cabra anti-ratón tras la absorción se empleó un ELISA tipo sándwich para cuantificar la cantidad de PSGL-1/mIgG2b en los sobrenadantes de células COS transfectadas. Normalmente, se transfectaron 5 matraces de cultivo (matraces de 260 ml, Nunclon TM) con células COS a una confluencia del 70% y se incubaron tal como se describe en Materiales y métodos. Tras un periodo de incubación de siete días en 10 ml de medio AIM V por matraz, se recogió el medio. Se determinó la concentración de proteína de fusión en el sobrenadante procedente de tal transfección, así como en diferentes volúmenes de sobrenadante tras la absorción en 100  $\mu$ l de suspensión de gel de perlas de agarosa-IgG anti-ratón (correspondiente a 50  $\mu$ l de perlas empaquetadas) mediante un ELISA calibrado con fragmentos Fc de IgG de ratón purificados (figura 2). La concentración de PSGL-1/mIgG2b en los sobrenadantes osciló entre 150 y 200 ng/ $\mu$ l, y en este experimento particular fue de aproximadamente 160 ng/ $\mu$ l (figura 2A, la columna no absorbida). La concentración de PSGL-1/mIgG2b que quedaba en 2, 4 y 8 ml de sobrenadante tras la absorción en 50  $\mu$ l de perlas empaquetadas de agarosa-IgG anti-ratón fue de 32, 89 y 117 ng/ $\mu$ l, respectivamente. Esto corresponde a 260, 290 y 360 ng de PSGL-1/mIgG2b que se absorben sobre 50  $\mu$ l de perlas empaquetadas de agarosa-IgG anti-ratón a partir de 2, 4 y 8 ml de sobrenadante, respectivamente. El análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western con la lectina 1134 de *B. simplicifolia* reveló que 50  $\mu$ l de perlas empaquetadas podían retirar por absorción la proteína de fusión PSGL-1/mIgG2b de 1 ml de sobrenadante hasta por debajo de lo detectable y de 2 ml hasta niveles apenas detectables.

**Abreviaturas:** BSA, albúmina sérica bovina; DXR, rechazo retardado de xenoinjerto; ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; FT, fucosiltransferasa; Gal, D-galactosa; GT, galactosiltransferasa; Glc, D-glucosa; Glc-NAc, D-N-acetilglucosamina; GlyCAM-1, molécula 1 de adhesión celular dependiente de glicosilación; HAR, rechazo hiperagudo; Ig, inmunoglobulina; MAdCAM, molécula de adhesión celular de adhesina de la mucosa; PAEC, células endoteliales aórticas porcinas; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; RBC, glóbulos rojos; SDS-PAGE, electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio).

### Ejemplo 2: Producción de vacunas de PSGL-1/mIg-ovoalbúmina.

Los datos descritos en el presente documento se generaron usando los siguientes reactivos y métodos.

**Cultivo celular:** se cultivaron células COS-7 m6 (Seed, 1987), CHO-K1 (ATCC CCL-61) y la línea celular de riñón embrionario humano 293 que expresa el antígeno T grande de SV40 (293T; proporcionada amablemente por B. Seed), en medio de Eagle modificado por Dulbecco (GibcoBrl, Life Technologies, Paisley, Escocia), complementado con suero bovino fetal al 10% (GibcoBrl, Life Technologies), sulfato de gentamicina 25  $\mu$ g/ml (Sigma, St. Louis, MO) y glutamina 2 mM (GibcoBrl, Life Technologies). Se hicieron pases de las células cada 2-4 días. Se cultivó el hibridoma HH14 (ATCC HB-9299; patente estadounidense 4.857.639) en RPMI 1640 (GibcoBrl, Life Technologies), complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l de estreptomycin y glutamina 2 mM.

**Materiales.** Agente de reticulación éster de N-[ $\gamma$ -maleimidobutiriloxi]sulfosuccinimida (Sulfo-GMBS) (22324, PIERCE, Rockford, IL 61105). Ovoalbúmina (A-7641, Sigma, St. Louis, Mo 63178). PSGL1/mIgG2b sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal. Tampón de acoplamiento: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, pH 7,2 columna de desalación Hi Trap™ (17-1408-01, Amersham Biosciences, SE-75184 Uppsala, Suecia). Columna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 (17-1166-01, Amersham Biosciences, SE-75184 Uppsala, Suecia).

**Métodos de producción de vacunas.** Se resuspendió la PSGL1/mIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal en el ejemplo 1 en tampón de acoplamiento a una concentración de 2 mg/ml. Se transfirieron 200  $\mu$ l de PSGL1/mIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal resuspendida a un tubo de 10 ml. Se disolvieron 2 mg de sulfo-GMBS en 1 ml de tampón de

5 conjugación, y se transfirieron inmediatamente 100  $\mu$ l de la disolución de sulfo-GMBS al tubo de ensayo que contenía la PSGL1/mIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal. Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se equilibra la columna de desalación con 15 ml de tampón de acoplamiento. Se aplican los 300  $\mu$ l de disolución de reacción sobre la columna de desalación Hi Trap™ usando un sistema de FPLC. Se eluye con alícuotas de 0,5 ml de tampón de acoplamiento. Se monitoriza la proteína eluida mediante la absorbancia a 280 nm. La PSGL1/mIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal activada con maleimida debe eluir en la fracción 5-6. Se disuelven 2 mg de ovoalbúmina en 500  $\mu$ l de tampón de acoplamiento durante la noche a temperatura ambiente. Se añade la disolución de ovoalbúmina a las fracciones reunidas que contienen PSGL1/mIgG<sub>2b</sub> sustituida con Gal $\alpha$ 1,3Gal activada con maleimida. Se incuban durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añade la disolución de guanidina 8 M al tubo de ensayo que contiene la proteína PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> conjugada con ovoalbúmina, hasta que la concentración de guanidina alcanza 6 M. Se equilibra la columna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 con 100 ml de PBS. Se aplican los 4,5 ml de volumen de reacción sobre la columna que se corre en el sistema de FPLC. Se eluye con alícuotas de 1,0 ml de PBS. Se monitoriza la elución de proteínas mediante la absorbancia a 280 nm. La proteína de acoplamiento debe eluir en la fracción 35-38 (véanse las figuras 6 y 7). Se dializa frente a agua para eliminar el PBS. Se congela y se liofiliza la proteína de acoplamiento. Se caracteriza la proteína de acoplamiento mediante análisis de ELISA e inmunotransferencia de tipo Western.

**Otras realizaciones**

20 Aunque se ha descrito la invención junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones

**REIVINDICACIONES**

1. Vacuna purificada que comprende:
  - 5 (a) un polipéptido adyuvante que comprende un primer polipéptido unido a un segundo polipéptido, en la que el primer polipéptido es un polipéptido de mucina y se glicosila por una  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa y el segundo polipéptido comprende una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina; y
  - 10 (b) un antígeno, en la que el polipéptido adyuvante se une operativa o covalentemente al antígeno.
- 15 2. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en PSGL-1, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC5a, MUC5b, MUC5c, MUC6, MUC11, MUC12, CD34, CD43, CD45, CD96, GlyCAM-1, MAdCAM, o un fragmento de los mismos.
- 20 3. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el primer polipéptido comprende al menos una región de un ligando 1 de glicoproteína de P-selectina.
4. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el primer polipéptido incluye una parte extracelular de un ligando 1 de glicoproteína de P-selectina.
- 25 5. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el primer polipéptido comprende los aminoácidos 19-319 del ligando 1 de P-glicoproteína humana.
6. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el primer polipéptido comprende múltiples epítopos Gal $\alpha$ 1,3Gal.
- 30 7. Vacuna según la reivindicación 4, en la que el primer polipéptido tiene el 60% o más de su masa debida al glicano.
8. Vacuna según la reivindicación 4, en la que el primer polipéptido tiene el 80% o más de su masa debida al glicano.
- 35 9. Vacuna según la reivindicación 4, en la que el primer polipéptido tiene el 90% o más de su masa debida al glicano.
10. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el polipéptido adyuvante es un dímero.
- 40 11. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en virus de la hepatitis C, VIH, virus de la hepatitis B, virus del papiloma, malaria, tuberculosis, virus del herpes simple, clamidia y de la gripe, o un componente biológico de los mismos.
- 45 12. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno asociado a tumores.
13. Vacuna según la reivindicación 12, en la que el antígeno asociado a tumores se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores de mama, pulmón, colon, próstata, páncreas, cervicouterino y melanomas.
- 50 14. Ácido nucleico aislado que codifica para la vacuna según la reivindicación 1.
15. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 14.
- 55 16. Célula que comprende el vector según la reivindicación 15,
17. Vacuna según la reivindicación 1, que comprende además un compuesto adyuvante.
18. Uso de la vacuna según la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para inmunizar un sujeto humano que corre el riesgo de desarrollar cáncer.
- 60 19. Uso de la vacuna según la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para la administración en una dosis eficaz para prevenir o aliviar un síntoma de cáncer en un sujeto afectado por cáncer.
- 65 20. Uso según la reivindicación 19, en el que dicho cáncer se selecciona de mama, pulmón, colon, próstata, páncreas, cervicouterino y melanoma.

21. Método *in vitro* de aumento de la secreción de anticuerpos en una células B, que comprende poner en contacto dicha célula con la vacuna purificada según la reivindicación 1, de manera que se aumenta la secreción de anticuerpos en dicha célula.
- 5 22. Método según la reivindicación 21, en el que se aumenta la secreción de anticuerpos en dicha célula directamente estimulando células B o indirectamente estimulando células T.
23. Método *in vitro* de aumento de la activación de célula inmunitaria que comprende poner en contacto dicha célula inmunitaria con la vacuna purificada según la reivindicación 1, de manera que se aumenta la activación de dicha célula.
- 10 24. Método según la reivindicación 23, en el que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en una célula B y una célula T.
- 15 25. Vacuna purificada según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección viral, bacteriana o fúngica o en el tratamiento de un sujeto que padece o que corre el riesgo de desarrollar cáncer.

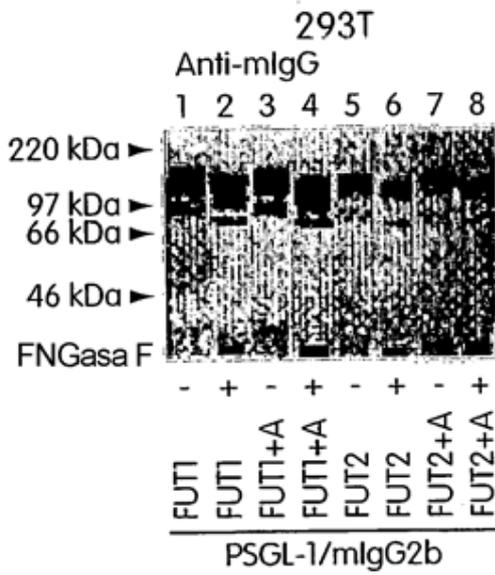


Fig. 1A

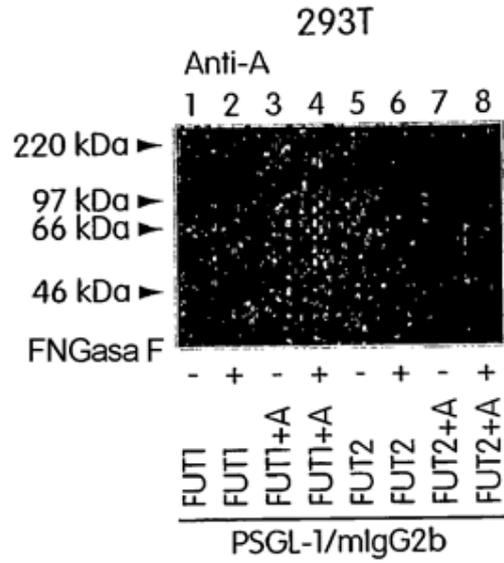


Fig. 1B

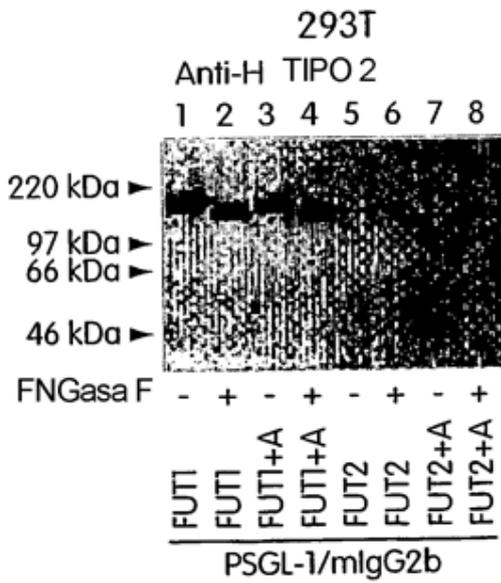


Fig. 1C

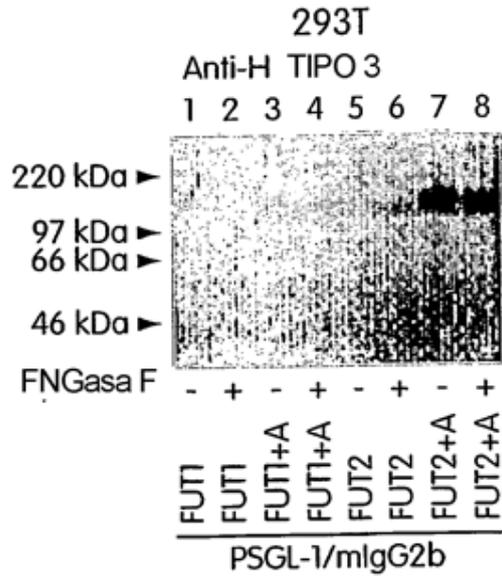


Fig. 1D

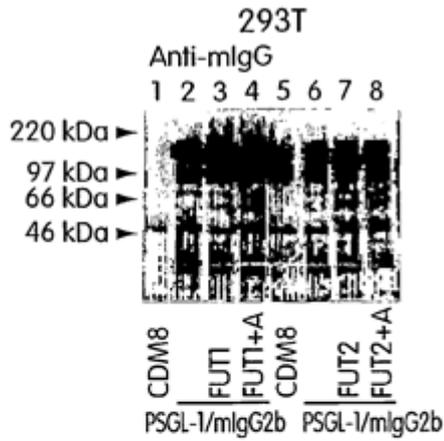


Fig. 2A

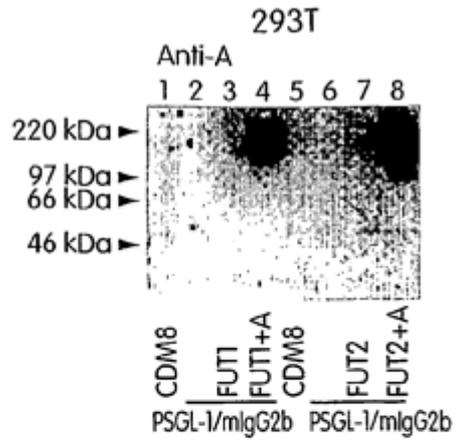


Fig. 2B

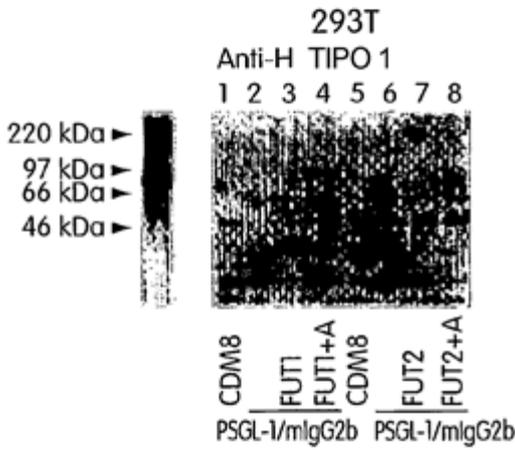


Fig. 2C

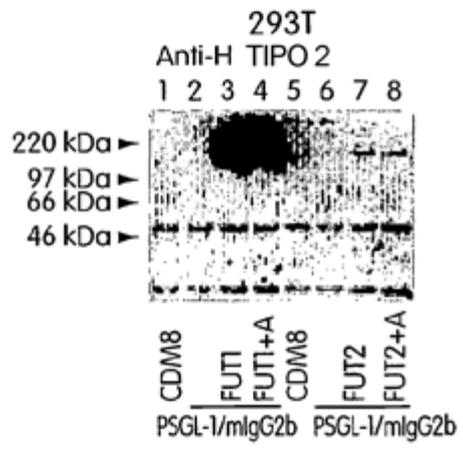


Fig. 2D

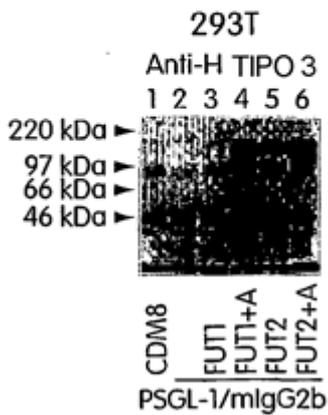


Fig. 2E

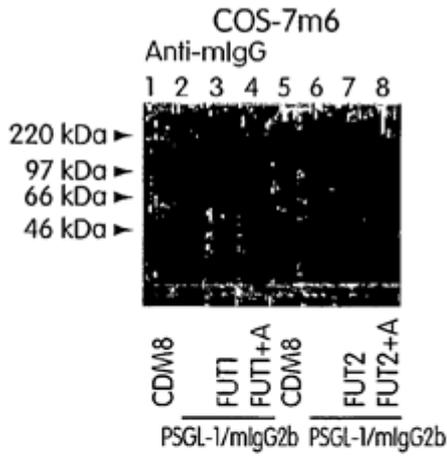


Fig. 3A

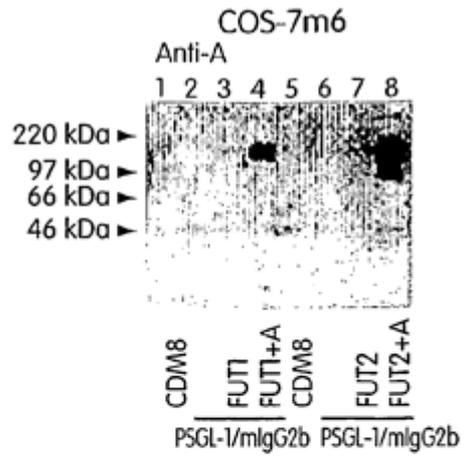


Fig. 3B

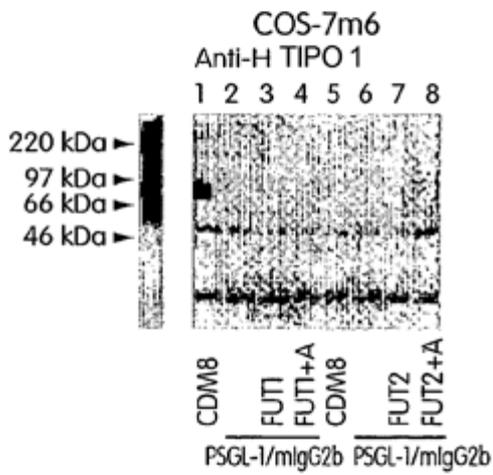


Fig. 3C

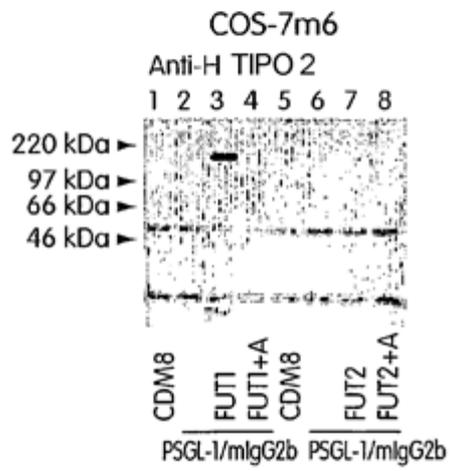


Fig. 3D

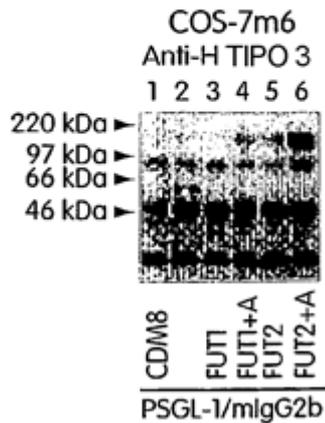


Fig. 3E

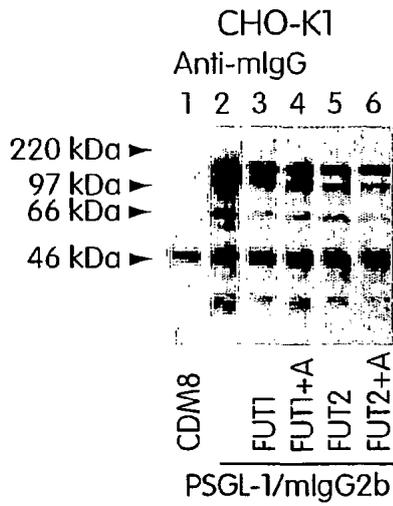


Fig. 4A

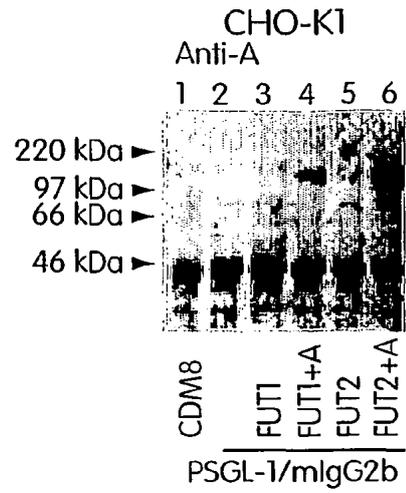


Fig. 4B

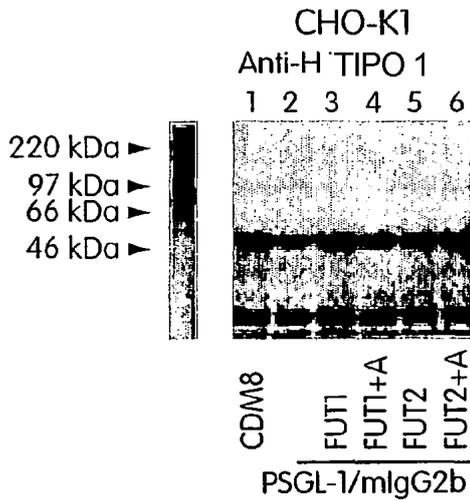


Fig. 4C

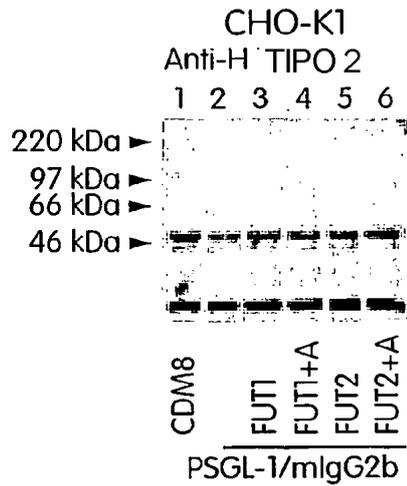


Fig. 4D

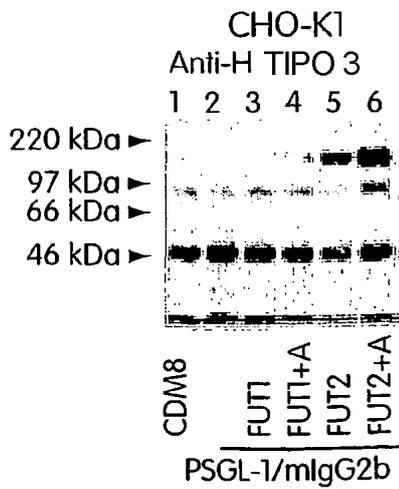


Fig. 4E

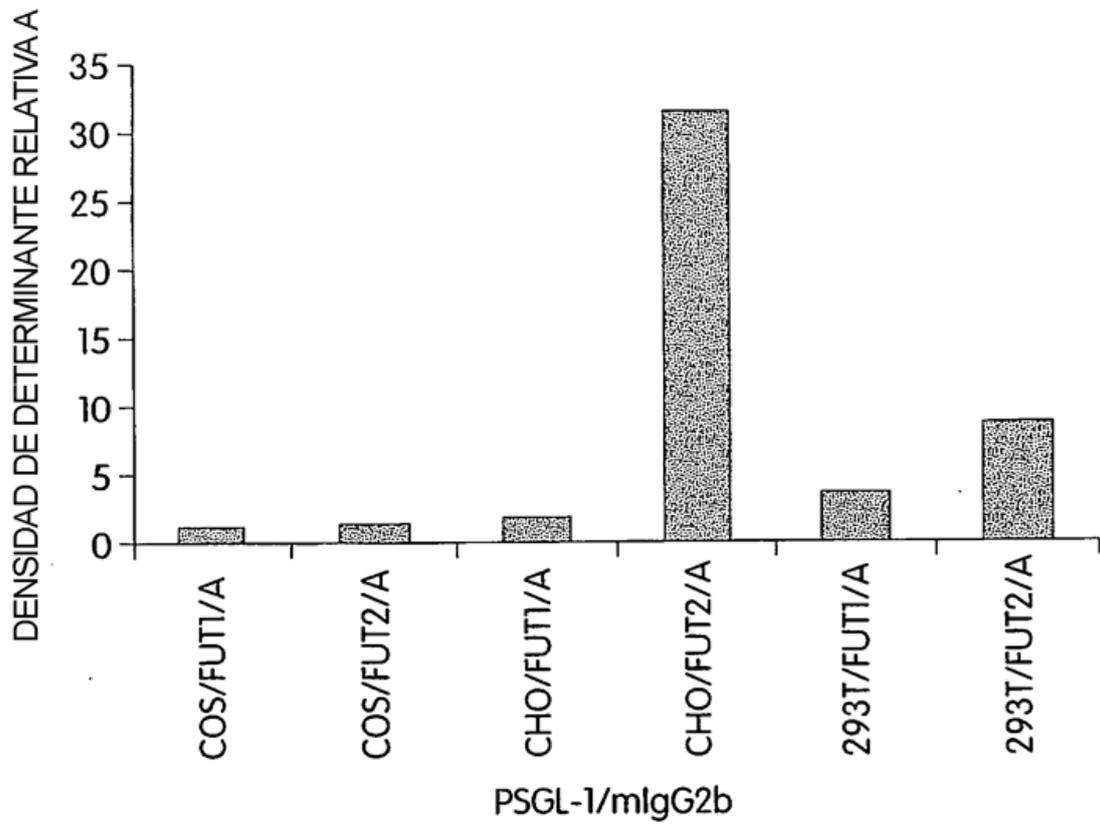


Fig. 5

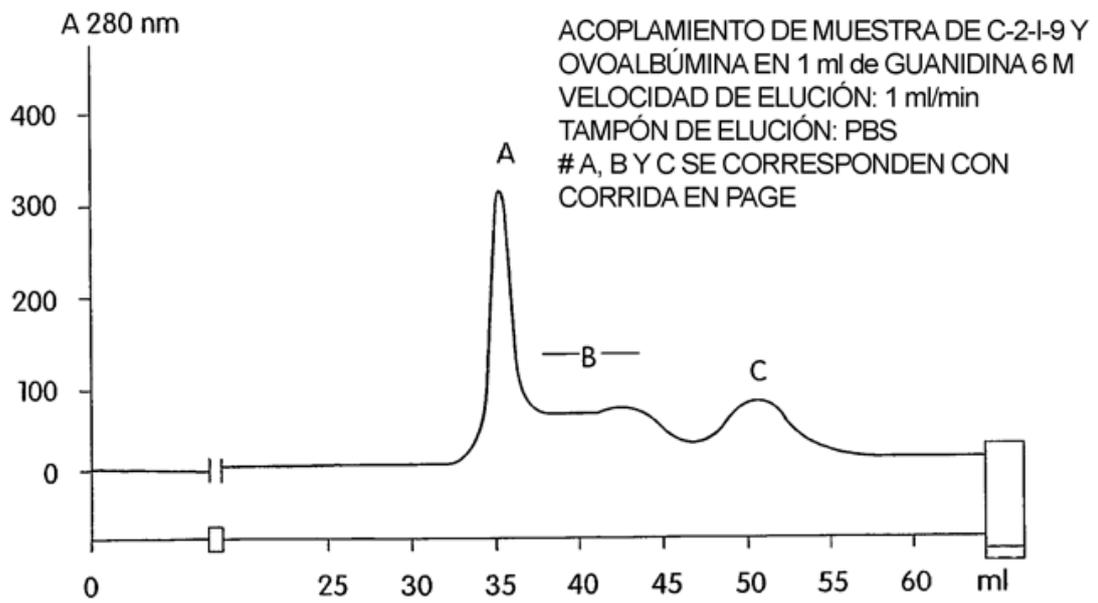


Fig. 6

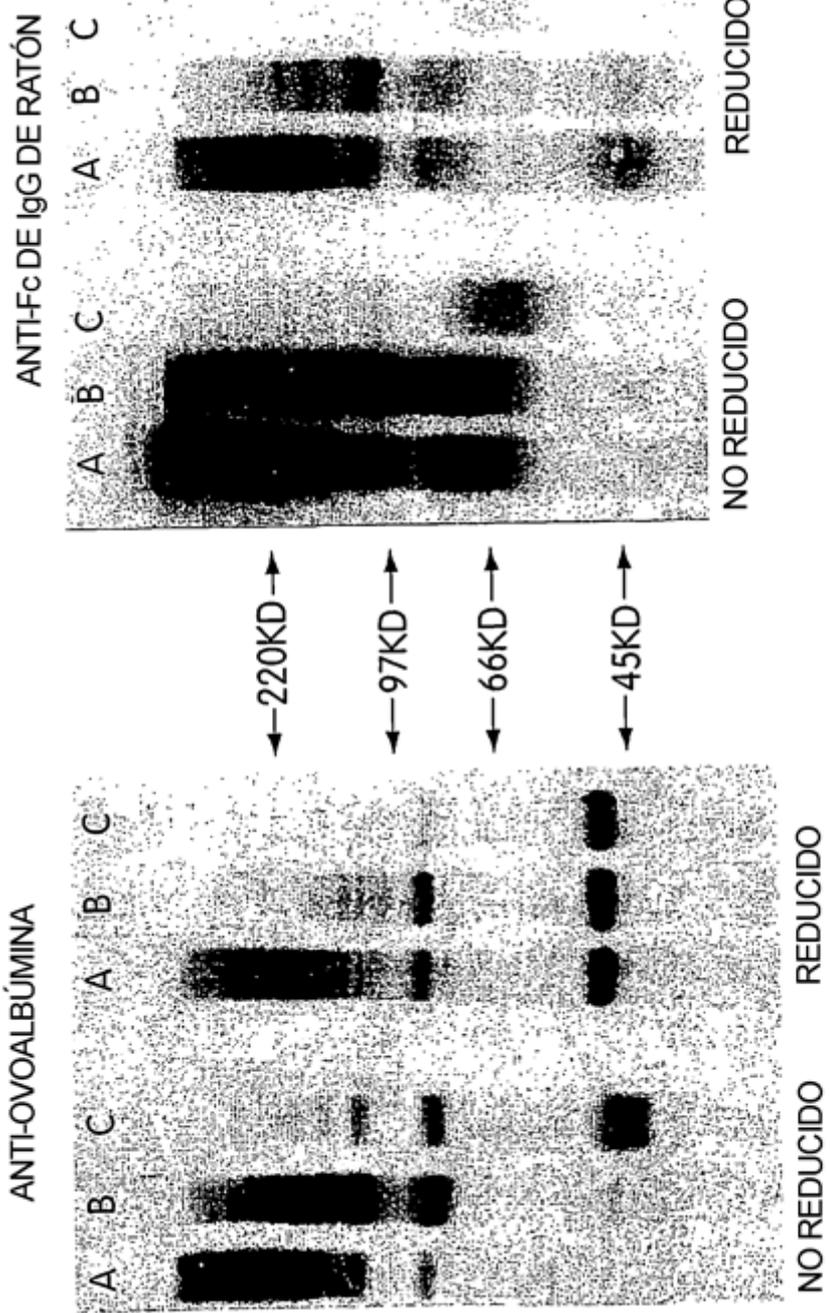


Fig. 7