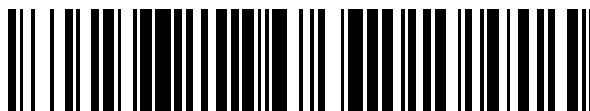


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 659**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06794018 .9**

96 Fecha de presentación: **13.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1913954**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **Uso del dominio EDA de fibronectina**

30 Prioridad:

13.06.2005 ES 200501412

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

12.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

12.12.2012

73 Titular/es:

PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
(100.0%)
Avenida Pío XII, 22 Oficina 1
31008 Pamplona, Navarra, ES

72 Inventor/es:

LECLERC, CLAUDE;
LASARTE SAGASTIBELZA, JUAN, JOSÉ;
GORRAIZ AYALA, MARTA y
PRIETO VALTUEÑA, JESÚS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 392 659 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

Uso del dominio EDA de fibronectina

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un vector proteínico para el transporte molecular a células que expresan el receptor RLT4 (receptor 4 de tipo Toll), la preparación de dicho vector proteínico y sus aplicaciones, con una particular incidencia en la preparación y uso de composiciones farmacéuticas, particularmente composiciones inmunoterapéuticas para el tratamiento y la prevención de una enfermedad infecciosa y tumoral.

Descripción de la técnica anterior

Los patógenos y el cáncer siguen siendo las causas principales de muerte a nivel mundial. El desarrollo de vacunas para evitar enfermedades para las cuales no existen actualmente vacunas, tales como SIDA o malaria, o para tratar infecciones crónicas o cánceres, así como la mejora de la eficacia y la seguridad de las vacunas existentes, sigue teniendo una elevada prioridad. En la mayor parte de los casos, el desarrollo de dichas vacunas requiere estrategias capaces de estimular específicamente los linfocitos T citotóxicos CD8+ (LTC).

Los LTC se activan mediante la presentación a los receptores de linfocitos T (RCT) de péptidos cortos asociados con moléculas I de tipo MHC. Estos complejos I de tipo péptido-MHC están presentes sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA), que son también capaces de proporcionar señales estimuladoras simultáneas requeridas para la activación óptima de los LTC.

Las células dendríticas (CD) son las CPA más potentes, con una capacidad única para interactuar con los linfocitos T sin exposición previa e iniciar respuestas inmunes primarias, activando los linfocitos T CD8+ citotóxicos y los linfocitos CD4+ auxiliares. Guernonprez y col. han revisado la presentación del antígeno y la estimulación de los linfocitos T por las CD ("Antigen presentation and T cell stimulation by DC". Annu. Rev. Immunol. 2002, 20: 621-627), que se incluye aquí por referencia.

En ausencia de respuestas inflamatorias e inmunes en curso, las células dendríticas patrullan a través de la sangre, tejidos periféricos, linfáticos, y órganos linfoides secundarios. En los tejidos periféricos, las células dendríticas capturan autoantígenos y no autoantígenos. A continuación se procesan los antígenos internalizados en péptidos proteolíticos, y estos péptidos se cargan sobre moléculas MHC de tipo I y II (para la activación de linfocitos T CD8+ o CD4+, respectivamente). Este proceso de captura, degradación, y carga del antígeno se denomina presentación del antígeno. Sin embargo, en ausencia de estimulación, las células dendríticas periféricas presentan antígenos de forma bastante ineficaz. La(s) señal(es) del (de los) patógeno(s) o la(s) señal(es) endógena(s) induce(n) células dendríticas que introducen un programa de desarrollo, denominado maduración, que transforma las células dendríticas en activadoras de las CPA y los linfocitos T. Los productos bacterianos y víricos, así como las citocinas inflamatorias y otras automoléculas, inducen la maduración de las células dendríticas a través de la interacción directa con los receptores superficiales celulares dendríticos innatos. Los linfocitos T, a través de las rutas dependientes e independientes de CD40, y las células endoteliales contribuyen a la maduración final de las células dendríticas mediante el contacto directo célula a célula y la secreción de las citocinas. Poco tiempo después de encontrar una señal de peligro se modifican la eficacia de captación del antígeno, el transporte y la degradación intracelular, y el tráfico intracelular de moléculas MHC. Se aumentan la carga peptídica, así como la semivida y la liberación en la superficie celular de moléculas MHC. También aumenta la expresión superficial de las moléculas coestimuladoras de los linfocitos T. De esta manera, las células dendríticas se convierten en las CPA más potentes y son las únicas capaces de activar los linfocitos T sin exposición previa y de iniciar las respuestas inmunes adaptativas. De manera simultánea con las modificaciones de sus capacidades presentadoras de antígenos, la maduración induce también la migración masiva de células dendríticas al exterior de los tejidos periféricos. Las modificaciones en la expresión de los receptores de la quimiocina y las moléculas de adhesión, así como cambios profundos en la organización del citoesqueleto, contribuyen a la migración de las células dendríticas, a través del sistema linfático, hacia los órganos linfoides secundarios.

Inducción de la maduración de las células dendríticas

Las células dendríticas responden a dos tipos de señales: reconocimiento directo de patógenos (a través de receptores específicos del reconocimiento de modelos) y la sensibilización indirecta de la infección (a través de las citocinas inflamatorias, compuestos celulares internos, y respuestas inmunes específicas en curso). En respuesta a estas señales, las células dendríticas se activan e introducen el programa de maduración, que transforma las células dendríticas en estimuladores eficaces de los linfocitos T. Se ha informado al menos de cinco tipos de receptores superficiales que estimulan la maduración de las células dendríticas: (i) receptores de tipo Toll (RLT) (ii) receptores de citocinas, (iii), moléculas de la familia (TNF-R) del receptor TNF (iv) FcR, y (sensores de muerte celular. Algunos de los estímulos de maduración más eficaces están mediados por la interacción de los RLT (TLR1-9) con sus respectivos ligandos. Kaisho y Akira revisaron los conocimientos acerca de los receptores de tipo Toll ("Toll-like receptors as adjuvant receptors". Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1589: 1-13). Los RLT se expresan en

macrófagos y células dendríticas así como en otras células tales como los linfocitos B. Se han identificado los ligandos de Los RLT. La mayor parte de estos ligandos se derivan de patógenos, pero no se encuentran en el hospedador, sugiriendo que los RLT son críticos para la sensibilización de los microorganismos invasores. El reconocimiento del ligando por el RLT provoca una rápida activación de la inmunidad innata induciendo la producción de citocinas proinflamatorias y la regulación en exceso de moléculas coestimuladoras. La inmunidad innata activada conduce posteriormente a una eficaz inmunidad adaptativa. Con respecto a RLT4, los modelos moleculares reconocidos específicamente son (bacterias Gram-), ácidos lipoteicoicos (bacterias Gram+), taxol, proteína F (Virus Respiratorio Sincitial), proteína 60 del choque térmico, y dominio EDA de la fibronectina.

Por tanto, una vacuna candidata capaz de inducir respuestas óptimas de los linfocitos T debe cumplir diversas condiciones. En primer lugar, tiene que dirigir las CPA para liberar epítomos de linfocitos T derivados de antígenos a moléculas MHC de tipo I y/o II. Por tanto, dirigir las CD representaría el principal objetivo en el diseño de nuevos sistemas de liberación para el desarrollo de vacunas. Además el vector ha de liberar las señales apropiadas a las CD para inducir su activación. La liberación del antígeno a las CD sin una señal de maduración induciría la tolerancia más bien que la activación de los linfocitos T auxiliares y citotóxicos. Además, su eficacia no debe verse afectada por la inmunidad preexistente frente al propio vector.

Una primera aproximación para liberar péptidos antigénicos a moléculas MHC de tipo I y/o II se basa en vacunas de péptidos sintéticos, que contienen epítomos seleccionados capaces de unirse directamente a estas moléculas sobre la superficie de la CPA. En algunos casos estos péptidos han llevado a la protección del tumor o al aclaramiento del virus en modelos de murino, mientras que en otros han llevado a la inducción de la tolerancia. Los ensayos clínicos humanos llevados a cabo con diferentes tipos de péptidos dan lugar a respuestas clínicas al cáncer modestas.

Un gran número de estrategias diferentes están actualmente en desarrollo. Básicamente, se pueden dividir en dos categorías. El primer tipo se basa en la síntesis del antígeno por la CPA o su liberación activa en el citoplasma de estas células y aprovecha la ruta clásica de procesamiento del antígeno MHC I. El segundo tipo aprovecha de capacidad de la presentación cruzada de la CPA y se basa en antígenos exógenos libres o asociados a células. La liberación del antígeno en el citoplasma de la CPA se ha llevado a cabo por medio de toxinas bacterianas (Morón y col. "New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway". *TRENDS in Immunology*, 2004; 25: 92-97). Como ejemplo, el documento EP1188446A1 se refiere a un vector proteínico basado en la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, por liberación de molécula a las células que expresan CD11b.

La presente invención se refiere a un dominio A extra (EDA) de fibronectina, un posible ligando natural de RLT4, como un medio teórico para la liberación del antígeno a células que expresan RLT4 que induciría una selección y maduración adecuadas de las CPA, y finalmente conduciría a una respuesta eficaz específica de los LTC. Las moléculas de fibronectina son productos de un único gen, y la proteína resultante puede existir en múltiples formas que surgen de un corte y empalme alternativo de un único pre-ARNm (Pankov R y Kenneth MY, "Fibronectin at a glance". *Journal of Cell Science*, 2002; 115: 3861-3863). Se produce un tipo principal de corte y empalme dentro del conjunto principal de las repeticiones de tipo III. La utilización u omisión del exón conduce a la inclusión o a la exclusión de cualquiera de dos repeticiones de tipo III: dominio B extra (denominado también EDB, EIIIB o EDII) y dominio A extra (denominado también EDA, EIIB o EDI). Las fibronectinas celulares, que contienen EDA y EDB cortados y empalmados de forma alternativa, se producen en respuesta a una lesión tisular. Entre otras funciones biológicas, EDA ha demostrado inducir la liberación de proteoglicano, y la expresión de metaloproteinasas (MMP 1, 3, y 9) y de citocinas proinflamatorias (para una revisión véase Saito S y col. "The Fibronectin Extradomain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mechanism", *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 3071-3076). Se ha descrito también que EDA es capaz de activar RLT4, induciendo de esta manera respuestas de tipo LPS (Okamura Y y col., "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4", *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 10229-10233).

Tal como se ha indicado anteriormente, el desarrollo de estrategias para el fortalecimiento de la respuesta inmune a un antígeno abre la puerta al desarrollo de vacunas para el tratamiento del cáncer o de las enfermedades infecciosas. Específicamente, en la infección debida al virus de la hepatitis C se ha descrito que la respuesta inmune juega un papel esencial en el aclaramiento de la infección, por tanto el uso de estrategias de inmunofortalecimiento constituye una alternativa para el tratamiento y la prevención de esta infección.

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ADN monocatenario que pertenece a la familia Flaviviridae (Miller RH. y Purcell RH. 1990. *PNAS*. 87: 2057). Este virus ha sido reconocido como uno de los principales agentes causales de la hepatitis crónica y las enfermedades hepáticas y se ha estimado que afecta a 170 millones de personas a nivel mundial (World-Health-Organisation. *Hepatitis C. Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 65). Una de las características principales de la infección de VHC es su elevada tendencia hacia la cronicidad (70% de infecciones) y el desarrollo de cirrosis hepática (20%) con un alto riesgo de desarrollo de hepatocarcinomas (Dienstag y col. *Gastroenterology* 1983; 85: 439). El tratamiento con IFN- α es la terapia más común en las infecciones por VHC, pero es solo eficaz es un 20-30% de pacientes tratados (Camps y col. *J Hepatol* 1993; 17: 390). La combinación de IFN- α y ribavirina ha mejorado estos resultados (30-40% de pacientes aclaran el virus de una manera sostenida), pero resta todavía un elevado porcentaje de pacientes resistentes a la terapia (Poynard y col. *Lancet* 1998; 352: 1426). De esta manera, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hepatitis C crónica es de vital importancia.

El genoma del VHC es de 9,6 kilobases, contiene regiones no codificantes muy conservadas en los extremos 5' y 3' que flanquean un amplio marco de lectura que codifica 3 proteínas estructurales (nucleares, E1 y E2) y al menos 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS5a y NS5b) (Major, ME y Feinstone SM. (1997) Hepatology 25, 1527).

El aclaramiento vírico después de una infección aguda por VHC o después del tratamiento con IFN- α está asociado a la presencia de una fuerte respuesta inmune celular de CD4 y CD8 a las proteínas víricas. Particularmente, la respuesta de CD4 a la proteína NS3 no estructural de VHC se ha asociado con el aclaramiento vírico tras la infección aguda, mientras que la ausencia de esta respuesta de linfocitos T implica la persistencia vírica y el establecimiento de una infección crónica (Diepolder y col. Lancet 1995; 346:1006, Pape y col J Viral Hepat 1999; 6 Suppl 1: 26-40). Análogamente, diversos estudios han identificado varios epítomos citotóxicos dentro de la proteína NS3 en pacientes infectados por VHC. Estos datos sugieren que la proteína NS3 sería una buena diana para la inducción de una respuesta celular anti VHC.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

a) el dominio EDA de la fibronectina (EDA), o

b) un fragmento de dicho dominio EDA capaz de unirse a RLT4, en la fabricación de una composición farmacéutica estimuladora de una respuesta inmune contra un antígeno, en el que dicha composición farmacéutica es una composición adyuvante inmunoestimuladora o una vacuna.

En la presente invención la composición farmacéutica puede incluir el dominio EDA de la fibronectina y el antígeno para el cual se desea generar la respuesta inmune, estando estos componentes presentes como entidades separadas o unidas covalentemente.

La presente invención se dirige también a un vector proteináceo caracterizado porque comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre:

a) un dominio EDA de fibronectina (EDA), o

b) un fragmento de dicho dominio EDA capaz de unirse a RLT4,

unido a una molécula de interés seleccionada entre: un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno parasítico, un antígeno tumoral, y un determinante antigénico tumoral.

De acuerdo con la invención, en una realización particular, la secuencia de aminoácidos del dominio EDA de fibronectina es la de cualquier forma natural de EDA que sea capaz de unirse a RLT4. Este dominio EDA se puede seleccionar entre las formas naturales del dominio en cualquier especie animal, particularmente mamíferos, es decir, roedores (ratones, ratas, etc.), o primates (particularmente seres humanos).

En otra realización específica los agentes inmunoestimuladores comprenden una secuencia de aminoácidos parcial de un dominio EDA que se caracteriza porque es capaz de unirse a RLT4.

Se describe también en la presente memoria descriptiva una variante modificada de cualquiera de dichas formas naturales o fragmentos de dicho dominio EDA, caracterizada también porque retiene la propiedad de unirse a RLT4.

En una realización particular descrita en la presente memoria descriptiva dicho dominio EDA variante tiene más de un 70% de homología con cualquiera de las formas naturales del dominio EDA. Se puede seleccionar una variante modificada adecuada comparando en primer lugar la secuencia de la forma natural del dominio EDA de fibronectina, o un fragmento de la misma, con otras secuencias polipeptídicas candidatas. Cualquier algoritmo de alineación (por ejemplo FASTA, Lipman DJ, Pearson WR. Rapid and sensitive protein similarity searches, Science. 22 de marzo de 1985; 227(4693): 1435-41), o software informático (es decir, Jellifish de Labvelocity Inc., o el software Blast de NCBI) se puede usar para el análisis de la homología. Posteriormente, las secuencias polipeptídicas candidatas que tienen más de un 70% de homología se ensayan para determinar su capacidad de unirse a RLT4. Se pueden evaluar las propiedades de unión de RLT4 por medio de cualquier ensayo de unión convencional, por ejemplo, usando citometría de flujo tal como se describe en The Current Protocols in Immunology y en The current protocols in Protein Science publicados por John Wiley & Sons (Editados por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober) (Actualizado periódicamente. Actualizado hasta el 1 de mayo de 2005).

En una realización de la invención el dominio EDA comprende una secuencia seleccionada entre:

a) la secuencia de aminoácidos completa del dominio EDA de ratón (Entrez Protein: NM_010233, aminoácidos 1721 a 1810; SEQ. ID. NO: 2, aminoácidos 2-91);

b) la secuencia de aminoácidos completa del dominio EDA humano (Entrez Protein NM_002026, aminoácidos 1631 a 1716; SEQ. ID. NO: 4); y

c) un fragmento de las secuencias a) y b) capaz de unirse a las células que expresan RLT4.

En otra realización particular, dicho dominio EDA comprende una secuencia seleccionada entre:

a) los aminoácidos 2-57 de la SED. ID: NO: 6, que corresponde a una forma alternativamente cortada y empalmada del dominio EDA de fibronectina de ratón;

b) SEQ. ID. NO: 8, que es una forma cortada y empalmada alternativamente del dominio EDA humano; y

c) un fragmento de las secuencias a) y b) capaz de unirse a las células que expresan RLT4.

En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador puede incluir además una o más moléculas de interés. Cuando está presente en el agente inmunoestimulador, la molécula de interés se puede administrar en una cantidad que, en combinación con los otros componentes del agente sea eficaz para generar una respuesta inmune contra la molécula.

En una realización preferida, el dominio EDA (o uno de sus fragmentos variantes) y la molécula de interés se unen conjuntamente en la misma molécula híbrida o vector proteináceo.

Se describe también en la presente memoria descriptiva un vector proteináceo tal como se ha descrito anteriormente en el que dicha molécula de interés se selecciona entre el grupo que consiste en polipéptidos, lipopéptidos, oligosacáridos, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, y sustancias químicas.

En una realización particular del vector proteináceo, dicha molécula de interés es un antígeno o un epítipo. En una realización de la invención el antígeno acoplado al vector es un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, o un antígeno parasítico. En una realización concreta, dicho antígeno vírico es un antígeno vírico procedente del virus de la hepatitis C, y en una realización preferida, dicho antígeno del virus de la hepatitis C es la proteína NS3 o un fragmento antigénico de la misma. La proteína NS3 se refiere a la proteína NS3 no estructural del virus de la hepatitis C, una proteína de 67 kDa que incluye dos dominios, una serina proteasa que comprende los 189 aminoácidos del extremo N terminal, y una helicasa nucleósido trifosfatasa que comprende 442 aminoácidos del extremo C terminal. La secuencia de la proteína NS3 incluida en el vector proteináceo de la invención puede corresponder a cualquier cadena o aislado del virus de la hepatitis C humana.

En otra realización, dicho antígeno es un antígeno tumoral o un determinante antigénico tumoral. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "epítipo" se refiere a una secuencia peptídica que se une a moléculas MHC de tipo I o tipo II y se puede reconocer por la molécula receptora del linfocito T de los linfocitos T CD8+ o CD4+ respectivamente, e induce una respuesta inmune.

En una realización específica, dicha molécula de interés es un determinante T citotóxico antigénico procedente de ovoalbúmina (OVA 257-264) o SIINFEKL (SEQ. ID. NO: 2, aminoácidos 95-102, que está flanqueada con 3 aminoácidos adicionales en el término C y el término N del epítipo, QLE-SIINFEKL-TEW).

El antígeno puede ser cualquier material capaz de producir una respuesta inmune de Th, una respuesta del linfocito T CD8, una respuesta de la célula NK, una respuesta del linfocito T γ/δ , o una respuesta del anticuerpo. Sin limitarse a ello, los antígenos adecuados incluyen péptidos, polipéptidos, lípidos, glicolípidos, polisacáridos, carbohidratos, polinucleótidos, priones, bacterias, virus u hongos vivos o inactivados; y antígenos derivados de bacterias, virus, hongos, protozoos, tumores o microorganismos, toxinas o toxoides.

En otra realización particular del vector proteináceo descrito en la presente memoria descriptiva, dicha molécula de interés es un alérgeno.

De esta forma, el dominio EDA actúa también como un vector para la liberación de antígenos a las células que expresan RLT4.

En otra realización particularmente interesante descrita en la presente memoria descriptiva, dicha molécula de interés es una sustancia química o un fármaco química o genéticamente acoplado al vector proteináceo. De esta forma, dicho vector proteináceo es útil para dirigir el fármaco específico a las células que expresan RLT4.

En una realización particular, el vector proteináceo puede comprender también una secuencia Tag, por ejemplo una cola de histidina N terminal. Esto simplificará el procedimiento de purificación cuando el vector proteináceo está fabricado por medio de procedimientos de ingeniería genética. Como ejemplo, las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID: NO: 6 representa realizaciones específicas del vector proteináceo de la invención. En una realización no limitante concreta de la presente invención, el vector proteináceo comprende la secuencia SEQ ID NO: 10, que comprende un

fragmento de la proteína NS3.

El dominio EDA incorporado en el vector proteináceo está caracterizado porque se une a RLT4 y facilita además la translocación de la molécula de interés en el citosol de las células que expresan RLT4.

5 Se describe también el uso del vector proteináceo para dirigir y translocar una molécula de interés en las células que expresan RLT4. En una realización concreta, las células que expresan RLT4 son cualquier tipo de células que presentan antígeno (CPA). En una realización preferida, dichas CPA son células dendríticas.

10 En una realización particular de la invención, el vector proteináceo se caracteriza porque facilita la translocación del antígeno o el epítipo de interés, favoreciendo además el procesamiento, y cargándose en moléculas MHC para la presentación del antígeno a los linfocitos T.

15 En otra realización, el vector proteináceo se caracteriza porque es capaz de estimular la maduración de las CPA dirigidas, aumentando de esta manera la expresión de las moléculas MHC y de las señales coestimuladoras. En una realización ventajosa particular, el vector proteináceo se caracteriza porque es capaz de inducir simultáneamente la presentación del antígeno y de promover la maduración de la CPA, induciendo de esta manera una eficaz respuesta inmune específica de antígeno. En una realización más preferida, esta respuesta inmune específica de antígeno es una respuesta de LTC.

20 El vector proteináceo se puede obtener mediante tecnología de ADN recombinante. De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico modificado que codifica un vector proteináceo de la invención. Este ácido nucleico puede deducirse fácilmente de la secuencia de ácido nucleico del vector proteináceo.

25 Este ácido nucleico modificado se puede contener dentro de una construcción de ADN. De esta manera, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica el vector proteináceo de la invención. Esta construcción de ADN puede incorporar una secuencia control unida operativamente al ácido nucleico que codifica el vector proteináceo de la invención. "Unido operativamente" cuando se refiere a ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleico. Las
30 "secuencias control" son señales de expresión reconocidas por una célula hospedadora específica, que regula funciones tales como la transcripción y la traducción de secuencias de codificación concretas (ejemplos de secuencias control son promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, sitios de unión a ribosoma, péptidos señal para la secreción de proteínas o para otras localizaciones subcelulares). La unión de las secuencias deseadas se lleva a cabo mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con los procedimientos convencionales. Una ventaja en este sentido está representada por el hecho de que esta construcción de ADN comprende también un marcador o gen que codifica un motivo o fenotipo que permite la selección de la célula hospedadora transformada por medio de la construcción de ADN. El ácido nucleico modificado y la construcción de
35 ADN planteados por esta invención se pueden obtener por medio de procedimientos convencionales bien conocidos que se resumen en muchos manuales de laboratorio (por ejemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory manual." Joseph Sambrook, David W. Russel Eds. 2001, 3ª ed. Cold Spring Harbor, Nueva York).

40 En una realización particular, el ácido nucleico modificado o la construcción de ADN proporcionados en la presente memoria descriptiva comprende la SEQ. ID. NO: 1, SEQ ID. NO: 5, SEQ ID NO: 9 (EDA-NS3) o SEQ ID NO: 11 (EDA-OVA).

45 El ácido nucleico modificado o la construcción de ADN proporcionados en la presente memoria descriptiva se pueden insertar en un vector adecuado. De esta manera, en otro aspecto, se proporciona un vector, tal como un vector de expresión, que comprende el ácido nucleico modificado mencionado o la construcción de ADN. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que este se va a insertar. Como ejemplo, el vector en el que el ácido nucleico se inserta puede ser un plásmido o un virus que, tras la inserción en la célula, puede o no integrarse en el genoma celular. El vector se puede obtener mediante procedimientos convencionales (Sambrook y col., 2001, citado más arriba).

55 En otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora transformada, que comprende un ácido nucleico modificado o una construcción de ADN. De acuerdo con la invención, la célula hospedadora de expresión es un procarionte, es decir, *Escherichia coli*, o un hospedador eucariota, es decir, una levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de insectos, o células de mamíferos.

60 En otra realización particular, el vector de expresión comprende el ácido nucleico modificado o la construcción de ADN que codifica el vector proteináceo de la invención, se pretende para la transferencia o la terapia génica *in vivo*. En una realización más particular, dicho vector de expresión es un vector vírico. Los vectores víricos adecuados a este efecto incluyen vectores derivados de: adenovirus, adenoasociados, retrovirus, lentivirus, alfavirus, herpesvirus, coronavirus, etc.

65 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un vector proteináceo de la invención, que

comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico modificado o una construcción de ADN de la invención, bajo condiciones que permiten la expresión del vector proteináceo. Las condiciones para optimizar el cultivo de la célula hospedadora dependerán del tipo de célula hospedadora empleada. Si se desea, el procedimiento para producir el vector proteináceo de la invención incluye el aislamiento y la purificación del mismo.

Alternativamente, se puede obtener el vector proteináceo mediante otros procedimientos convencionales. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, síntesis química en fase sólida; purificación con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); y, si se prefiere, análisis mediante técnicas convencionales tales como secuenciación o espectrometría de masas, análisis de aminoácidos, técnicas de resonancia magnética, etc.

En otra realización, se puede obtener el vector proteináceo mediante enlace covalente del polipéptido con la secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio EDA de fibronectina (EDA), o un fragmento de dicho dominio EDA capaz de unirse a RLT4, o una variante de dicho dominio EDA, con la molécula de interés (por ejemplo, polipéptidos, lipopéptidos, oligosacáridos, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, u otras sustancias químicas). Esto se puede llevar a cabo usando los procedimientos convencionales resumidos en los manuales de laboratorio, por ejemplo, "The current protocols in protein chemistry", publicado por John Wiley & Sons (actualizado periódicamente. Actualizado hasta el 1 de mayo de 2005), o "Immobilized affinity ligand Techniques", GT Hermanson, AK Mallia y PK Smith, Academic Press, Inc. San Diego, CA, 1992.

Posteriormente de acuerdo con la invención, el vector proteináceo, o el ácido nucleico modificado y las construcciones de ADN que codifican el mismo, o los vectores de expresión y las células hospedadoras de expresión que incorporan dichos ácidos nucleicos o las construcciones de ADN, se pueden usar en la preparación de una composición farmacéutica.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso del polipéptido con la secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio EDA de fibronectina (EDA), o un fragmento o variante del mismo, tal como se ha descrito previamente, en la preparación de un agente inmunoestimulador, caracterizado porque dicho agente es una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, se puede usar la composición farmacéutica para estimular la maduración de las células presentadoras de antígeno, o para inducir una respuesta inmune eficaz específica de la molécula de interés. En una realización particular, se puede usar dicha composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune Th1 en un sujeto en el cual se administra la composición inmunoestimuladora. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "inducir una respuesta inmune Th1" puede incluir casos en los que la composición inmunoestimuladora induce una respuesta Th1/Th2 mixta. En otros casos, sin embargo, la composición inmunoestimuladora puede inducir una respuesta inmune Th1 con poca o sustancialmente ninguna inducción de una respuesta inmune Th2. En una realización concreta, se puede usar dicha composición farmacéutica para inducir una respuesta de los LTC.

En algunas realizaciones, se puede usar la composición inmunoestimuladora como un adyuvante inmunoestimulador, por ejemplo, combinándose con uno o más antígenos, tanto con como sin adyuvantes adicionales. De esta manera, en algunos casos, la composición inmunoestimuladora puede formar una vacuna. En otros casos, la composición inmunoestimuladora puede servir como un adyuvante que se puede usar junto con una vacuna.

La composición inmunoestimuladora que incluye el polipéptido que comprende el dominio EDA de fibronectina (o uno de sus fragmentos) puede potenciar la expansión de los linfocitos T CD8+ activados, la generación de linfocitos T CD8+ con memoria, o ambos. De esta manera, la composición inmunoestimuladora de la invención puede potenciar la inmunidad mediada por células específicas de antígeno en un sujeto que recibe la composición inmunoestimuladora.

En una realización concreta, la composición inmunoestimuladora comprende el dominio EDA de fibronectina (o uno de sus fragmentos o variantes) es útil para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad infecciosa, una enfermedad tumoral, o una enfermedad alérgica. En una realización concreta de la presente invención, dicha composición se usa para el tratamiento y la profilaxis de la hepatitis C.

La composición inmunoestimuladora que comprende el dominio EDA de fibronectina (o uno de sus fragmentos o variantes) puede contener adicionalmente vehículos, excipientes, y otros ingredientes conocidos farmacéuticamente aceptables.

La composición inmunoestimuladora se puede administrar a animales, por ejemplo, mamíferos (humanos o no humanos), aves, y similares, de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, por vía oral, subcutánea, nasal, tópica).

Se describe también en la presente memoria descriptiva un procedimiento terapéutico y/o profiláctico que incluye administrar una composición inmunoestimuladora que comprende el dominio EDA de fibronectina (o uno de sus fragmentos o variantes) a un sujeto.

Las rutas de administración adecuadas incluyen la absorción transdérmica o transmucosal, inyección (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, etc.), ingestión, inhalación, y similar.

5 En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye al menos un vehículo farmacéutico aceptable y una cantidad eficaz del vector proteináceo en al menos una de sus formas o realizaciones de expresión:

- a) el vector proteináceo en forma polipeptídica;
- 10 b) un ácido nucleico modificado que codifica dicho vector proteináceo;
- c) un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico modificado; o
- 15 d) células hospedadoras de expresión que comprenden también dicho ácido nucleico modificado.

En otra realización particular, la composición farmacéutica se caracteriza porque comprende una cantidad eficaz de células dendríticas, en el que dicha células dendríticas se han incubado *in vitro* con el vector proteináceo en al menos una de sus formas o realizaciones de expresión. En una realización más particular, dicha composición farmacéutica es una vacuna o composición inmunoterapéutica.

Más aún, algunos usos adicionales del vector proteináceo se proporcionan mediante la presente memoria descriptiva. En una realización de la invención, el vector proteináceo en cualquiera de sus formas de expresión se usa para la preparación de una composición farmacéutica eficaz para inducir la maduración de las células dendríticas *in vitro* o *in vivo*.

En otra realización, dicho vector proteináceo se usa para la preparación de una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune específica contra la molécula de interés (antígeno o epítipo) acoplada al vector proteináceo. Esta respuesta inmune es una respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos contra la molécula de interés), una respuesta del linfocito T auxiliar, o una respuesta del linfocito T citotóxico. En una realización preferida, dicha respuesta inmune es una respuesta de los LTC.

En una realización más particular, que se refiere al uso del vector proteináceo, se proporciona en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad infecciosa. Dicha enfermedad infecciosa puede ser una enfermedad infecciosa bacteriana, vírica, fúngica o parasítica.

En otra realización particular, se proporciona el uso de vector proteináceo de la invención en la preparación de una composición farmacéutica útil para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad tumoral.

40 En otra realización más particular, la invención se refiere al uso del vector proteináceo en la preparación de una composición farmacéutica útil para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad alérgica. Numerosas enfermedades alérgicas están relacionadas con la activación de una respuesta inmune Th2. De esta manera, una desviación, o una interrupción de la respuesta Th2 a Th1 usando el vector proteináceo que transporta un alérgeno concreto, puede tener un efecto protector o terapéutico sobre la enfermedad alérgica.

45 De acuerdo con una realización concreta descrita en la presente memoria descriptiva, la composición farmacéutica propuesta se usa para la administración a un hospedador animal o humano. Se puede usar cualquier ruta de administración adecuada. En una realización particular, la composición farmacéutica se administra mediante una ruta parenteral (es decir, intravenosa, subcutánea, intramuscular), una ruta transdérmica, o una ruta mucosa.

50 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Análisis SDS-PAGE de las proteínas EDA y EDA-SIINFEKL producidas y purificadas. Se introdujo una alícuota de las proteínas EDA y EDA-SIINFEKL sobre un gel de poliacrilamida al 15% y se sometió a electroforesis. Los marcadores de los pesos moleculares (MWM) se indicaron en kDa. Se observó una banda correspondiente al presunto peso molecular de las proteínas EDA y EDA-SIINFEKL (13-14 kDa).

Figura 2. Unión del vector proteináceo EDA-SIINFEKL a TLR24. 2A Ensayos de unión directa. Células HEK293-LacZ (HEK293-LacZ) y células HEK293-RLT4/MD2/CD14 (HEK293-RLT4) se sometieron a pulso con 1 μ m de EDA-SIINFEKL, fijas con paraformaldehído, se etiquetaron con anticuerpos dirigidos contra His y contra EDA, se desarrollaron con FITC dirigido contra IgG de ratón y se analizaron mediante citometría de flujo. 2B. Capacidad de EDA de inhibir la unión de anticuerpos dirigidos contra RLT4 con células que expresan RLT4. Se incubaron células HEK-RLT4 durante 2 horas a 4°C en presencia o ausencia de 500 nm de proteína EDA-SIINFEKL. Se lavaron e incubaron las células con anticuerpos dirigidos contra RLT4 teñidos con FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. 2C. Porcentaje de inhibición de la unión del anticuerpo dirigido contra RLT4 con células que expresan RLT4 mediante uso de diferentes concentraciones de proteína EDA-SIINFEKL. 2D. Ensayos de adhesión celular. Se dispensaron

células HEK-hTLR4 o HEK-LacZ teñidas con timidina tritiada en pocillos de una microplaca de 96 pocillos previamente revestida con proteína EDA y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se eliminaron las células no adherentes mientras que las células adherentes se recogieron y se midió la radioactividad incorporada en un contador por centelleo Topcount. Se calculó el número de células adherentes por pocillo con la ayuda de curvas normalizadas.

Figura 3. EDA-SIINFEKL activa la ruta de señalización de RLT4. Medida colorimétrica del gen de la fosfatasa alcalina embrionaria humana secretada en seres humanos en los sobrenadantes del cultivo de células que expresan HEK293/RLT4-MD2-CD14 o HEK293/LacZ transfectadas con este gen indicador cuya expresión está controlada por un promotor ELAM-1 inducible por NF-κB. 24 horas después de la transfección, se incubaron las células en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de LPS, proteína EDA-SIINFEKL 100 nm (EDA), o proteína EDA-SIINFEKL 100 nm previamente digerida con proteinasa K. Las barras representan las veces de inducción de NF-κB (DO obtenida con sobrenadantes procedentes de HEK293/RLT4-MD2-CD14 dividida por la DO obtenida con sobrenadantes procedentes de HEK293/LacZ).

Figura 4. EDA-SIINFEKL induce la secreción de citocinas proinflamatorias por las CD *in vitro*. Se cultivaron CD derivadas de médula ósea en presencia de LPS (1 µg/ml), EDA-SIINFEKL (500 nm), EDA-SIINFEKL (500 nm) digerida con proteinasa K, o solución salina. Después de 24 h, se midieron la presencia de IL-12 (A) y TNF-α (B) en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

Figura 5. EDA-SIINFEKL induce la maduración de las CD CD11c *in vivo*. La maduración de las células dendríticas es un requisito para la estimulación óptima de una respuesta de linfocitos T. Cuando se produce la maduración, las CPA aumentan la expresión de las moléculas superficiales tales como las moléculas MHC de tipo I (H2K^b en el modelo de los inventores) y MHC de tipo II (IA^b en el modelo de los inventores), CD40, CD80 y CD86. Por tanto, los inventores analizaron si EDA-SIINFEKL podrían inducir la maduración de las células que expresaban CD11c *in vivo*. Se inmunizaron ratones C57BL/6 silvestres i.v. con 25 µg de EDA-SIINFEKL, 25 µg de EDA-SIINFEKL digerida con proteinasa K, 25 µg de LPS o solo con PBS. También, se inmunizaron ratones C57BL/6 RLT4 KO con 25 µg de EDA-SIINFEKL o solo con PBS. Quince horas más tarde se sacrificaron los ratones y las células CD11c se purificaron mediante autoMACS. Se etiquetaron las células y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de moléculas H-2Kb, 1-Ab, CD40, CD80 y CD86.

Figura 6: EDA-SIXNFEKL se presentó eficazmente por las células dendríticas a los linfocitos T específicos del epítipo de SIINFEKL. Los inventores caracterizaron la capacidad de EDA-SIINFEKL de captarse por las CPA para la presentación del epítipo SIINFEKL de los LTC procesados a los linfocitos T procedentes de ratones transgénicos OT-1, específicos de este epítipo. (A) Producción de IFN-γ mediante células no adherentes procedentes de ratones transgénicos OT-1. Se cultivaron CD derivadas de médula ósea en presencia solo de medio, diferentes concentraciones de péptido SIINFEKL sintético, SIINFEKL y EDA, EDA-SIINFEKL (proteína de fusión) o solo EDA. Veinticuatro horas después se recogieron las CD y se usaron como CPA en presencia de 10⁵ células OT-1 no adherentes. Después de otras 24 horas, se recuperó el sobrenadante y se midió el IFN-γ secretado. (B) Dependencia de la molécula RLT4. Se incubaron células de hibridoma B3Z (10⁵ células/pocillo) en presencia de esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 silvestres o con esplenocitos procedentes de ratones con genes inactivados para la molécula RLT4 (10⁵ células/pocillo) y la proteína EDA-SIINFEKL (100 nM). (C) Esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 silvestres se cultivaron simultáneamente con células de hibridoma B3Z y proteína EDA-SIINFEKL en presencia o ausencia de un anticuerpo dirigido contra RLT4. (B y C) la cantidad de IL-2 secretada en el sobrenadante del cultivo se midió mediante un bioensayo basado en el uso de la línea celular CTLL. (D) Efecto de la cloroquina, monensina, brefeldina o cicloheximida sobre la presentación del antígeno de la proteína de fusión EDA-SIINFEKL. Se incubaron células dendríticas derivadas de médula ósea durante 1 hora en ausencia o presencia de cloroquina 30 mM, brefeldina, monensina o 4 µg/ml de cicloheximida, antes de la adición de EDA-SIINFEKL o del péptido sintético SIINFEKL (barras blancas). Después de 10 horas en cultivo, dichas CD se fijaron en glutaraldehído y se usaron como células presentadoras de antígeno (CPA) (10⁴ células/pocillo) en cultivos simultáneos con células de ratón OT-1 no adherentes (10⁵ células/pocillo). 24 horas después, se midió la cantidad de IFN-γ secretado mediante un ELISA comercial. Para estudiar si la expresión de RLT4 sobre las CPA podría favorecer el proceso de presentación los inventores cultivaron células de hibridoma B3Z (específicas del epítipo de SIINFEKL) en presencia de esplenocitos procedentes de ratones C57BL/6 silvestres o de ratones RLT4 KO, y diferentes concentraciones de EDA-SIINFEKL (nM). Se midió la cantidad de IL-2 liberada en el sobrenadante del cultivo mediante un bioensayo basado en CTLL (Figura 6E).

Figura 7. La inmunización de ratones con EDA-SIINFEKL induce una respuesta celular específica del epítipo de SIINFEKL. Los resultados anteriores demuestran que la proteína recombinante EDA-SIINFEKL es bioactiva y activa específicamente las CPA. La inducción de las respuestas inmunes de los linfocitos T específicos *in vivo* es crítica para el desarrollo de una vacuna. De esta manera los inventores han probado si los ratones inmunizados con la proteína de fusión EDA-SIINFEKL desarrollaron respuestas celulares específicas contra este epítipo. (A) Inducción de células productoras de IFN-γ. En los días 0 y 10, se inmunizaron ratones C57BL/6 con 1,5 nmol de EDA-SIINFEKL o con 1,5 nmol del péptido SIINFEKL. En el día 20, se incubaron esplenocitos durante 48 horas en presencia o ausencia de SIINFEKL, y se midió la cantidad de IFN-γ secretado mediante ELIS. (B) Inducción del

análisis de respuesta de LTC específicos de SIINFEXL. Se volvieron a estimular los esplenocitos de ratones inmunizados con EDA-SIINFEXL o con SIINFEXL durante 5 días en presencia del péptido SIINFEXL. Tras esta incubación, se midió la actividad de los LTC contra las células diana EL-4, en ausencia o en presencia del péptido SIINFEXL mediante un ensayo de liberación de cromo⁵¹ convencional. Los datos representan los porcentajes promedio de los valores de la lisis específica neta (% de lisis de una célula diana sometida a pulso con SIINFEXL menos el % de lisis de una célula diana no sometida a pulso) de muestras por triplicado.

Figura 8. EDA-SIINFEXL protege del estímulo tumoral con células que expresan EG7 OVA. Para estudiar la capacidad de la proteína de fusión EDA-SIINFEXL para proteger ratones frente a la inyección de células tumorales EG7OVA, se inmunizaron ratones s.c. en los días 0 y 10 con 3 nmol de EDA-SIINFEXL, SIINFEXL o con solución salina. Veinte días después de la segunda inmunización, se estimularon los ratones s.c. con 10⁵ células EG7OVA. Se vigiló el crecimiento tumoral usando un calibre y se expresó en milímetros cúbicos usando la fórmula $V = (L \times w^2)/2$, en la que L, longitud; w, anchura. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen mayor de 8 cm³.

Figura 9. EDA actúa como un adyuvante en la inducción de respuestas citotóxicas tras la inmunización con la proteína OVA. Existe la posibilidad de que si EDA es capaz de promover la maduración de las células dendríticas *in vivo*, pueda actuar como un agente adyuvante tras la inmunización con una proteína que contiene el epítipo citotóxico, pero sea incapaz de activar una respuesta citotóxica por sí mismo. Para probar esta posibilidad, los inventores inmunizaron un grupo de ratones con 50 µg de EDA con 500 µg de proteína OVA (A) y otro grupo de ratones con 500 µg de OVA (B), sin usar ningún otro tipo de adyuvante. Una semana después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se cultivaron los esplenocitos en presencia del péptido sintético SIINFEXL. Después de 5 días de cultivo, se midió la respuesta citotóxica a las células diana EL-4 sometidas a pulso con el péptido SIINFEXL en un ensayo de liberación de Cr⁵¹ convencional.

Figura 10. EDA puede actuar como un vehículo para antígenos más grandes. En los experimentos previos, se ha probado que la proteína EDA puede actuar como un vehículo para transportar un epítipo citotóxico y favorecer la inducción de una respuesta de los LTC contra dicho epítipo. En la última etapa los inventores desearían estudiar si EDA era capaz de transportar un antígeno más grande y facilitar la inducción de una respuesta celular frente a dicho antígeno. Con este objetivo los inventores construyeron la proteína de fusión EDA-OVA y llevaron a cabo los siguientes experimentos *in vitro* e *in vivo*. (A) Análisis SDS-PAGE de la proteína EDA-OVA recombinante. La proteína EDA-OVA recombinante se expresó en *E. coli*, se purificó mediante cromatografía de afinidad, se desaló, se detoxificó, se concentró y se analizó mediante SDS-PAGE. Se observó una banda de aproximadamente 55 kDa, correspondiente al presunto peso molecular de dicha proteína. (B) Experimentos de presentación del antígeno. Se cultivaron CD derivadas de médula ósea en presencia o ausencia de OVA, EDA-OVA (proteína de fusión), EDA más OVA, o solo EDA. 24 horas después, se usaron las CD como células presentadoras de antígeno en presencia de 10⁵ células no adherentes procedentes de ratones OT-1. Se cuantificó la producción de IFN-γ por células no adherentes procedentes de ratones OT-1 en presencia de CD mediante un ELISA comercial. (C) La proteína EDA-OVA induce los LTC específicos de OVA *in vivo*. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con 1 nmol de EDA-OVA o con 1 nmol de OVA. Siete días después de la inmunización, se volvieron a estimular los esplenocitos de los ratones inmunizados *in vitro* durante 5 días en presencia del péptido SIINFEXL. Posteriormente, se midió la actividad de los LTC específicos frente a células EL-4 incubadas en ausencia o presencia de SIINFEXL en un ensayo de liberación de Cr⁵¹ convencional. Los datos representan los porcentajes promedio de los valores netos de la lisis específica (% de lisis de una célula diana sometida a pulso con SIINFEXL menos % de lisis de una célula diana no sometida a pulso) procedentes de muestras por triplicado.

Figura 11. La proteína EDA-NS3 produce una respuesta de los LTC específica frente a la proteína NS3 del virus de la hepatitis C. Habiendo observado que la proteína EDA podría actuar como un vehículo para antígenos grandes, se analizó la capacidad de EDA para inducir una respuesta antiviral a la proteína NS3 del virus de la hepatitis C (aminoácidos 1-196 procedentes de la región de la proteasa de la proteína NS3), como una estrategia de vacunación frente a la infección por dicho virus. (A) análisis SDS-PAGE de proteína EDA-NS3 recombinante (1-196). Se construyó la proteína de fusión recombinante EDA-NS3 y se expresó en *E. coli*, y se analizó mediante SDS-PAGE. (B) La proteína EDA-OVA induce los LTC específicos de OVA *in vivo*. Se inmunizaron ratones HHD (transgénicos para la proteína HLA-A2.1), mediante ruta iv con 100 µg/ratón de proteína EDA-NS3 disuelta en solución salina. Una semana después de la inmunización, se volvieron a estimular los esplenocitos *in vitro* con el péptido NS3 1073 (que contiene un determinante T citotóxico inmunodominante procedente de la proteína NS3 para la restricción HLA-A2). Después de 5 días de cultivo, se midió la actividad citotóxica frente a las células diana T2 incubadas con el péptido 1073(V) (SEQ ID NO: 20, CVNGVCWTV), o con la variante 1073(L) de dicho péptido (SEQ ID NO: 21, CLNGVCWTV) o en ausencia del péptido, usando un ensayo de liberación de Cr⁵¹ convencional. (C) La proteína EDA-NS3 induce una respuesta multiépítópica frente a diferentes epítopos de la proteína NS3. Los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con EDA-NS3 se volvieron a estimular *in vitro* durante 48 horas en presencia de los péptidos 1038-1046, NS3 1073-1081 o NS3 1169-1177 (que contiene tres determinantes citotóxicos) para la restricción HLA-A2 dentro del fragmento 1-196 de la proteína NS3) o con la proteína NS3 recombinante (Mikrogen). Se midió la cantidad de IFN-γ en el sobrenadante mediante un ELISA comercial. (D) La proteína EDA-NS3 induce una respuesta citotóxica de larga duración. Se inmunizaron ratones HHD mediante ruta

i.v. con 100 µg/ratón de proteína EDA-NS3 en solución salina. Sesenta días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se midió la presencia de LTC específicos del péptido NS3 1073 en un ensayo de liberación de cromo⁵¹ convencional, utilizando células diana T2 incubadas en ausencia o presencia del péptido NS3 1073. (E) La inmunización de ratones C57BL/6 con CD incubadas con EDA-NS3 protege a los ratones de la infección por el virus vaccinia recombinante vHCV (1-3011) que expresa las proteínas del virus de la hepatitis C. Se inmunizaron los ratones con 10⁶ CD previamente incubadas con la proteína EDA-NS3 y 7 días después recibieron un estímulo de 5 x 10⁶ virus vaccinia vHCV (1-3011) mediante ruta i.p. Tres días después de la infección se sacrificaron los ratones y se cuantificó en mg la carga vírica del tejido ovárico, mediante un ensayo de infección de células BSC-1.

Ejemplos

Ejemplo 1. El dominio A extra de fibronectina interactúa con RLT4 y activa la ruta de señalización de RLT4

1.1. Materiales y procedimientos

1.1.1. Expresión de EDA y de las proteínas recombinantes del vector proteináceo EDA-SIINFEKL

Preparación del vector proteináceo recombinante

Se amplificó el dominio A extra (EDA) de fibronectina mediante la RT-PCR usando cebadores específicos y ARN de hepatocitos obtenidos de ratones tratados con concanavalina-A para inducir daño hepático [Lasarte y col, Hepatology. 2003; 37(2):461-70.]. Las secciones de tejido hepático se homogeneizaron y lisaron en Ultraspec (Biotecx, Houston, TX, EE.UU.) usando un Ultraturax Driver T.25 (Janke & Kunkel, Ika-Labortechnik, Alemania). Se aisló el ARN de acuerdo con los procedimientos de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159). Se transcribió de manera inversa el ARN (60 min a 37°C) con 200U de transcriptasa inversa M-MuLV (Gibco-BRL) en un volumen de 20 µl de tampón 5 x RT (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) suplementado con ditiotretol 5 mM (DDT), dioxosinucleósido trifosfato 0,5 mM (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 25U de inhibidor de la ribonucleasa (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) y 200 ng de hexámeros aleatorios (Boehringer Mannheim). Tras calentar (95°C, 1 min) y enfriar rápidamente en hielo, 0,3 µg del combinado de ADNc se usaron para la amplificación de la PCR en 20 µl de 10x disolución tampón (Tris-HCl 100mM pH9.3, KCl 500 mM, Triton X-100 al 1%) que contenía dNTP 0,08 mM, cebadores en la dirección 5' y 3' (40 ng de cada uno) MgCl₂ 1,5 mM y 2U de ADN polimerasa *Taq* (Promega Corporation). El cebador en la dirección 5' fue (SEQ. ID. NO: 13)

5' CCATATGAACATTGATCGCCCTAAAGGACT 3'

(las bases subrayadas se añadieron a los cebadores para introducir una secuencia reconocida por la enzima de restricción NdeI mientras que la secuencia en cursiva corresponde al comienzo de EDA)

y el cebador en la dirección 3' (SEQ. ID. NO: 14)

5' AGCGGCCG**CCATT**CAGTCAGT**TTTTTCAAAGTTGATTATACTCTCAAGCTGTGTG**
GACTGGATTCCAATCAGGGG 3'

(las bases subrayadas se añadieron a los cebadores para introducir la secuencia reconocida por la enzima de restricción NotI, la secuencia en negrita corresponde a la secuencia que codifica el epítipo OVA de los LTC (SIINFEKL) flanqueado por tres aminoácidos en ambos extremos QLESIINFBRLTEV, mientras que la secuencia en cursiva corresponde al extremo de EDA)

El fragmento amplificado mediante la PCR se clonó en pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Este plásmido se digirió con NdeI y NotI y el fragmento del ADN resultante se subclonó en el plásmido pET20b digerido con NdeI/NotI (Novagen), que permite la expresión de proteínas de fusión que transportan seis restos de histidina (etiquetas 6xHis) en el término carboxilo.

El plásmido pET20b2-26 resultante que expresaba la proteína de fusión EDA-SIINFEKL-6xHis se transfectó en células BL21 (DE3) para la expresión del vector proteináceo recombinante. Las células transfectadas se hicieron crecer en 1 l de LB a 37°C hasta que se alcanzó una DO600 de 0,5-1. Se añadió IPTG al cultivo a una concentración final de 0,4 mM y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se recogieron las células mediante centrifugación, se volvieron a suspender e Tris-HCl 0,1 M pH = 7,2, se trataron con lisozima, se perturbaron usando una prensa francesa (dos pases a 20.000 pst), se clarificaron mediante centrifugación y se filtraron. La proteína de fusión presente en la fracción soluble se purificó mediante cromatografía por afinidad (Hisrap, Pharmacia) utilizando una plataforma FPLC (AKTA, Pharmacia). La proteína eluida se desaló usando columnas de desalación Hitrap (Pharmacia), y se concentró usando un dispositivo de filtración Amicon Ultra 4-5000 MWCO Centrifugal (Millipore Carrighwahill, Irlanda). El vector proteináceo recombinante se purificó a partir de endotoxinas usando columnas Endotrap (Profos Ag, Regensburg, Alemania) hasta que los niveles de endotoxina

estuvieron por debajo de 0,2 UE/ μ g de proteína (evaluado mediante el ensayo LAL, Cambrex).

Para obtener un plásmido de expresión de la proteína EDA, se llevó a cabo una PCR usando los cebadores CCATATGAACATTGATCGCCCTAAAGGACT (SEQ ID NO: 13) y AGCGGCCGCTGTGGACTGGATTCCAATCA GGGG (SEQ ID NO: 15) y estrategias de clonación similares a las descritas para el plásmido EDA-SIINFELK, dando como resultado el plásmido pET20bEDA1.2. Se añadieron 20 μ g de proteína a cada muestra en un gel de SDS-acrilamida al 15%, seguido por tinción con azul de Coomassie. Se observó una banda correspondiente al presunto peso molecular (13 kDa).

1.1.2. Unión de EDA-SIINFELK a RLT4. Ensayos de citometría de flujo y adhesión

Para probar si la proteína EDA-SIINFELK recombinante era capaz de unirse a las células que expresaban RLT-4, los inventores utilizaron HEK293 que expresaban RLT4-MD2-CD14 humano (de Invivogen). Los inventores utilizaron también células HEK293 transfectadas con LacZ (Invivogen) como control negativo. Se sometieron a pulso las células con EDA-SIINFELK 1 mM durante 1 h a 4°C, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min. Después de 3 lavados, las células se marcaron con 1/100 anticuerpos dirigidos contra His (Qiagen) y 1/200 anticuerpos dirigidos contra CD16 (FcBlock, de Becton Dickinson) durante 1 hora y 30 min. Después de tres lavados, las células se incubaron durante 30 min con una dilución 1/100 de un anticuerpo dirigido contra una IgG de ratón etiquetado con fluoresceína y se analizaron mediante citometría de flujo.

Alternativamente, se midió la capacidad de la proteína EDA-SIINFELK para inhibir la unión del anticuerpo dirigido contra RLT4 humana teñido con FITC con las células HEK-hTLR4. Para esto, se incubaron células HEK RLT4 durante 2 h a 4°C en presencia o ausencia de diferentes dosis de EDA-SIINFELK. Posteriormente, se lavaron las células y se incubaron con anticuerpos dirigidos contra RLT4 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de inhibición para diferentes concentraciones ensayadas de EDA-SIINFELK. Se llevaron a cabo ensayos de adhesión celular. Las células HEK LacZ o HEK hTLR4 se tiñeron previamente con timidina tritiada y se dispensaron en placas de 96 pocillos previamente revestidas con proteína EDA. Después de 2 horas de incubación a 37°C, se eliminaron las células no adherentes mientras que las células adheridas se recogieron y se midió la radioactividad incorporada en un contador por centelleo Topcount. Se calculó el número de células adherentes por pocillo con la ayuda de las curvas patrón obtenidas usando diferentes concentraciones de células teñidas.

1.1.3. Activación de la ruta de señalización de RLT4

Se transfectaron células de expresión HEK293/hTLR4-MD2-CD14 o HEK293/LacZ con un plásmido que transportaba el gen de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada en seres humanos (SEAP) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invivogen). La expresión de SEAP se controló mediante un promotor RLM-1 inducible por NF- κ B (pNiFty-SEAP (Invivogen)). Veinticuatro horas después de la transfección se incubaron las células en presencia o ausencia de LPS, proteína EDA-SIINFELK 100 nM o proteína EDA-SIINFELK 100 nM previamente digerida con proteinasa K. Después de 24 horas, se midió la expresión del gen indicador en los sobrenadantes del cultivo mediante un ensayo colorimétrico (Invivogen). En la figura 3, las barras representan el factor de veces de inducción NF- κ B (DO obtenida sobre sobrenadantes a partir de HEK293/RLT4-MD2-CD14 dividido por DO obtenido sobre sobrenadantes a partir de HEK293/LacZ). La cantidad de contaminantes de endotoxina en preparaciones EDA en este ensayo estuvo por debajo de 0,0003 μ g/ml.

1.2. Resultados

1.2.1. Expresión de proteínas de fusión EDA t EDA-SIINFELK recombinantes

La proteína EDA-SIINFELK se expresó en E. coli como una proteína de fusión 6xHis (SEQ. ID. NO: 2), se purificó mediante cromatografía de afinidad, se desaló y se purificó de endotoxinas tal como se describe en la sección de procedimientos. Las proteínas resultantes se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia western utilizando anticuerpos dirigidos contra His (Figura 1) Se observó una banda correspondiente al presunto peso molecular (13 kDa) para cada proteína.

1.2.2. La proteína de fusión RDA-SIINFELK se une a RLT4

Se ha descrito que el dominio A extra de la fibronectina activa el receptor 4 de tipo Toll (Okamura y col, JBC, 2001;

276: 10229-10233). Sin embargo no existe evidencia directa de unión física de EDA a RLR4. Los inventores analizaron en primer lugar si la proteína EDA-SIINFELK tenía la capacidad de unirse a células que expresaban RLT4. Se sometieron a pulso células HEK293 que expresaban RLT4-MD2-CD14 humana o células HEK293 transfectadas con LacZ (Invivogen) con 1 μ M de proteína EDA-SIINFELK, marcada con anticuerpos dirigidos contra His y un anticuerpo dirigido contra IgG de ratón etiquetado con fluoresceína (véanse los procedimientos) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se encontró que las células HEK 293 que expresaban RLT4-MD2-CD14 humana presentaban una intensidad de fluorescencia ligeramente mayor que las células HEK 293 que expresaban

LCZ (Figura 2A). Se midió también la capacidad de la proteína EDA-SIINFEKL de inhibir la unión del anticuerpo teñido con fluoresceína a RLT4 humana. Los resultados mostraron que la incubación previa de células HEK-hTLR4 con proteína EDA-SIINFEKL 500 nM inhibió aproximadamente un 50% de dicha unión de anticuerpo (Figura 2B). La Figura 2C muestra el efecto inhibitor de diferentes dosis de EDA-SIINFEKL sobre dicha unión de anticuerpo. Por otra parte, los inventores midieron la capacidad de HEK hTLR4 y el control de las células HEK LacZ del control de unirse en un ensayo de adhesión, a pocillos de plástico previamente revestidos con proteína EDA. Estos muestra que las células HEK hTLR4 son capaces de unirse específicamente a los pocillos que contienen EDA. Todos estos experimentos indican que las proteínas EDA y EDA-SIINFEKL son capaces de unirse a RLT4.

1.2.3. La proteína de fusión BDA-SIINFEKL activa la ruta de señalización de RLT4

La señalización de RLT4 conduce a la translocación de NF- κ B, un factor de transcripción que se une a elementos consenso en el interior de los promotores de una variedad de genes. Para determinar si la proteína EDA-SIINFEKL recombinante puede activar RLT4, los inventores utilizaron células HEK293/hTLR4-MD2-CD14 o HEK293/LacZ transfectadas con un plásmido que transportaba el gen de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada en seres humanos (SEAP) bajo el control de un promotor ELAM-1 inducible por NF- κ B (pNiFty-SEAP (Invivogen)). Los inventores encontraron que la proteína EDA-SIINFEKL era capaz de estimular la expresión de SEAP solo en células HEK293/hTLR4-MD2-CD14 transfectadas, alcanzando un factor de veces de inducción NF- κ B de 7, similar al que se encontraba cuando se incubaban las células con 0,01 μ g de LPS (Figura 3). Esta capacidad de estimular la translocación nuclear de NF- κ B estaba completamente abrogada si la proteína EDA-SIINFEKL se digería previamente con proteinasa K (Figura 3), sugiriendo que la activación de EDA de RLT4 no se puede tener en cuenta debido a la potencial contaminación de LPS en la preparación de proteína recombinante,

1.3. Discusión

Los inventores construyeron el plásmido pET20b2-26 recombinante que permitió la expresión de la proteína de fusión recombinante EDA-SIINFEKL 6xHis en *E. coli*. La presencia de 6 histidinas facilita la detección y purificación de la proteína de fusión. De esta manera, los inventores fueron capaces de purificar a partir de la fracción citoplasmática de cultivos de *E. coli* cantidades considerables de la proteína de fusión. Los ensayos de unión llevados a cabo sobre células que expresaban RLT4 sugirieron que la proteína EDA-SIINFEKL es capaz de unirse a RLT4 específicamente. Además, los inventores demuestran aquí que EDA-SIINFEKL es capaz de activar la ruta de señalización de RLT4. Esta activación no está relacionada con la potencial contaminación de LPS de la proteína, debido a que la digestión previa con proteinasa K aboga la capacidad de estimular la translocación nuclear de NF- κ B. Además, la cantidad de contaminantes de endotoxina en la preparación de EDA en este ensayo estaba por debajo de 0,0003 μ g/ml (tal como se evaluó mediante el ensayo LAL) que es incapaz de activar la ruta de señalización de RLT-4 en este ensayo *in vitro*. Estos resultados sugieren que la proteína EDA podría utilizarse como vehículo proteínico para dirigir antígenos a células que expresan RLT4. Se sabe que las células dendríticas expresan receptores de tipo toll y particularmente RLT4. Se sabe también que algunos de los estímulos de maduración más potentes para las CD provienen de la interacción de los receptores RTL con sus respectivos ligandos. De esta manera, la interacción de una proteína de fusión que contiene EDA y un cierto antígeno podría favorecer la rápida activación de la inmunidad innata induciendo la producción de citocinas proinflamatorias y la regulación en exceso de moléculas coestimuladoras. Además, el direccionamiento de esta proteína de fusión a la superficie de la CD aumentaría la captura y la endocitosis del antígeno por la CD y consecuentemente potenciar la respuesta inmune frente a este antígeno.

Ejemplo 2. Las proteínas de fusión que contienen EDA inducen la maduración de las células dendríticas *in vitro* e *in vivo* y permite la inducción de linfocitos T citotóxicos

2.1. Materiales y procedimientos

2.1.1. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea

Se hicieron crecer células dendríticas a partir de células de médula ósea. Tras lisar los eritrocitos con tampón de lisis ACK, se lavaron las células y se eliminaron posteriormente de linfocitos y granulocitos mediante incubación con una mezcla de anticuerpos dirigidos contra CD4 (GK1; ATCC, Manassas, VA), CD8 (53.6.72; ATCC), Ly-6G/Gr1 (BD-Pharmingen; San Diego CA) y CD45R/B220 (BD-Pharmingen) seguido por complemento de conejo. Las células restantes se hicieron crecer a 10^6 células/ml en placas de 12 pocillos en medio completo suplementado con 20 ng/ml de mGM-CSF y 20 ng/ml de mIL-4 (ambos de Peprotech; Londres, Reino Unido). Cada dos días, se sustituyó el medio con medio reciente que contenía citocinas. Se recogieron las células dendríticas no adherentes en el día 7 y se cultivaron en presencia o ausencia de 1 μ g/ml o 15 ng/ml LPS (Sigma), EDA-SIINFEKL (500 nM) o SIINFEKL (10 μ M) a 37°C y CO₂ al 5%. En algunos experimentos, se añadió Polimixina (10 μ g/ml) a los cultivos para inhibir el efecto de los contaminantes de endotoxina. Después de 24 h de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se midieron la IL-12 y el TNF- α mediante ELISA (BD-Pharmingen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.1.2. Medida de la maduración *in vivo* de células CD11c tras la inmunización con EDA-SIINFEKL. Efecto de la

digestión con proteinasa K

Se evaluó la maduración de CD *in vitro* mediante citometría de flujo midiendo la expresión de diversos marcadores superficiales. Se inyectaron ratones C57BL6 i.v. con 25 µg de EDA-SIINFEKL, 25 µg de EDA-SIINFEKL digerido con proteinasa K, 25 µg de LPS o solo con PBS. La digestión de EDA-SIINFEKL con proteinasa K se llevó a cabo utilizando agarosa-proteinasa K (Sigma, San Luis). De manera breve, se usaron 5 mg/ml de perlar de proteinasa agarosa en tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, ClCa₂ 1 mM) para digerir la proteína EDA-SIINFEKL o LPS durante 20 min a 30°C. Se retiraron las perlas de Agarosa-proteinasa K mediante centrifugación. Quince horas después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se purificaron las células CD11c mediante autoMACS. Se marcaron las células y se analizaron mediante citometría de flujo.

2.1.3. Estudios *in vitro* para analizar la capacidad de presentación del antígeno

Los inventores caracterizaron la capacidad de EDA-SIINFEKL de ser capturado por las CPA para presentar el epítipo de SIINFEKL de los LTC procesados a los linfocitos T de ratones transgénicos OT-1, o de la línea celular T de hibridoma B3Z, ambas específicos de este epítipo. Se cultivaron CD derivadas de médula ósea en presencia de diferentes concentraciones de EDA-SIINFEKL, EDA y SIINFEKL (no unidas covalentemente) o SIINFEKL. Después de veinticuatro horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de IFN-γ mediante ELISA. Alternativamente, 12 horas después del inicio del cultivo, se recogieron las CD, se fijaron con glutaraldehído al 0,05% y se usaron como CPA en presencia de diferentes cantidades de células no adherentes procedentes de OT-1 o en presencia de la línea celular T de hibridoma B3Z. En algunos experimentos, se incubaron las CD en presencia o ausencia de cloroquina (3 µM), monensina (1 µl de Golgystop, Pharmingen), brefeldina (1 µl de Golgyplug, Pharmingen), cicloheximida (4 µg/ml), y a continuación se incubaron en presencia de EDA-SIINFEKL o péptido SIINFEKL. En algunos casos se añadió anticuerpo dirigido contra TLR4 a los cultivos.

La activación de las células B3Z en presencia de CPA tratadas se llevó a cabo midiendo la producción de IL-2. Las células de hibridoma B3Z (10⁵ células/pocillo) se cultivaron en medio completo (RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina), 100 µg/ml de estreptomycin y 5 x 10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol) durante 18 horas en presencia de esplenocitos (10⁵ células/pocillo) a partir de ratones C57BL/6 silvestres o a partir de ratones TLR4 KO, y diferentes concentraciones de EDA-SIINFEKL. La cantidad de IL-2 liberada en el sobrenadante del cultivo se midió mediante un bioensayo basado en CTLL tal como se ha descrito previamente.

2.1.4. Medida de la inducción *in vivo* de linfocitos T citotóxicos (LTC) y de células productoras de IFN-γ tras la inmunización

Se inmunizaron ratones C57BL6 i.v. con 50 µg de EDA-SIINFEKL o con SIINFEKL en los días 0 y 10. En el día 20, se sacrificaron los ratones para el análisis de la respuesta de los LTC frente a SIINFEKL. Los esplenocitos de animales inmunizados se cultivaron en presencia de 0,1 µg/ml de SIINFEKL a 5 x 10⁶ células/ml (10 ml) durante 5 días en medio completo. En el día 5, se recogieron las células para los ensayos de liberación de cromo. Se midió la actividad lítica incubando durante 4 h diferentes números de células efectoras con 1 x 10⁴ células diana EL-4 previamente cargadas con ⁵¹Cr y con o sin SIINFEKL: Se calculó el porcentaje de lisis específico de acuerdo con la fórmula. (cpm experimental – cpm espontánea)/(cpm máxima – cpm espontánea) x 100, en el que la lisis espontánea corresponde a las células diana incubadas en ausencia de células efectoras y la lisis máxima se obtiene incubando células diana con Triton x 100 al 5%.

Para medir la producción de IFN-γ en respuesta a SIINFEKL, se plaquearon esplenocitos de ratones inmunizados en placas de 96 pocillos a 8 x 10⁵ células/pocillo solo con medio completo, o con 30 µM de péptido en un volumen final de 0,25 ml. Se retiraron los sobrenadantes (50 µl) 48 horas después y se midió el IFN-γ mediante ELISA (Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En otro grupo de experimentos se ha probado la capacidad de la proteína EDA para actuar como un adyuvante en una mezcla de proteínas. En este caso, se inmunizó un grupo de ratones C57BL/6 por vía i.v. con 50 µg de EDA-SIINFEKL en presencia de 500 µg de proteína OVA en PBS mientras que otro grupo se inmunizó con 500 µg solo de proteína OVA en PBS. Una semana después se sacrificaron los ratones para determinar la respuesta de los LTC frente a SIINFEKL en ambos grupos, tal como se ha indicado anteriormente.

2.1.5. Protección frente al estímulo de las células tumorales EG7OVA

Se inmunizaron los ratones s.c. en los días 0 y 10 con 3 nmol de EDA-SIINFEKL o SIINFEKL. Veinte días después de la segunda inmunización se estimularon los ratones s.c. con 10⁵ EG7OVA. Se controló el crecimiento tumoral con un calibre y se expresó en mm³ utilizando la fórmula $V = (L \times w^2)/2$, en el que L es la longitud; w, la anchura. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen mayor de 8 cm³.

2.2. Resultados

2.2.1. La proteína de fusión EDA-SIINFEKL estimula la producción de IL-12 y TNF- α por las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC)

Los inventores examinaron si la proteína EDA-SIINFEKL era capaz de estimular BMDC para producir citocinas proinflamatorias tales como IL-12 o TNF- α . De esta manera, se cultivaron BMDC con SIINFEKL (10 μ M), LPS (1 μ g/ml y 15 ng/ml) de EDA-SIINFEKL-6xHis (500nM). Veinticuatro horas después, se midieron IL-12 o TNF- α en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA. Se encontró que EDA-SIINFEKL era capaz de estimular la producción de niveles muy altos de IL-12 o TNF- α por BMDC (Figura 4). Esta capacidad inmunoestimuladora desapareció cuando la proteína se trató previamente con proteinasa K, indicando que esta actividad no fue debida a posibles trazas de endotoxina en las muestras de proteína.

2.2.2. EDA-SIINFEKL induce la maduración *in vivo* dependiente de TLR4 de CD que expresan CD11c

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno más potentes con una única capacidad para estimular linfocitos T sin exposición previa y respuestas secundarias a antígenos. Las CD tienen la capacidad de capturar antígenos, procesarlos en péptidos y presentar los péptidos en asociación con moléculas MHC de tipo I o II a los linfocitos T citotóxicos (LTC) o a los linfocitos T auxiliares, respectivamente. Las CD inmaduras pueden capturar antígenos pero pueden diferenciarse o madurar para llegar a ser capaces de estimular linfocitos T sin exposición previa. De esta manera, la maduración de las células dendríticas es un requerimiento para la óptima estimulación de una respuesta de los linfocitos T. Cuando se produce la maduración, las CPA aumentan la expresión de las moléculas superficiales tales como las moléculas MHC de tipo I y II, CD40, CD80 y CD86. Por tanto, los inventores analizaron si EDA-SIINFEKL podría inducir la maduración de las células que expresan CD11c *in vivo*. Se inmunizaron ratones C57BL/6 *i.v.* con 25 μ g de EDA-SIINFEKL, 25 μ g de EDA-SIINFEKL digerida con proteinasa K, 25 μ g de LPS o solo con PBS. Quince horas después se sacrificaron los ratones y se purificaron las células CD11c mediante autoMACS, anticuerpo etiquetado y se analizaron mediante citometría de flujo. Los inventores encontraron que la inmunización con EDA-SIINFEKL era capaz de inducir la expresión de moléculas MHC de tipo I y tipo II, CD40 y CD86. Esta capacidad de EDA-SIINFEKL estaba completamente abrogada cuando se digirió la proteína con proteinasa K antes de la inmunización (Figura 5). La digestión de LPS con proteinasa K no tiene ningún efecto inhibitor sobre la capacidad de LPS de inducir la expresión de estos marcadores de la maduración (no se muestra). Los inventores probaron la capacidad de EDA-SIINFEKL de inducir la maduración de células CD11c a partir de ratones C57BL/6 TLR4 KO y los inventores encontraron que EDA-SIINFEKL era incapaz de inducir la expresión en exceso de los marcadores de la maduración que se encuentran en ratones C57BL/6 silvestres (Figura 5).

2.2.3. Las células dendríticas presentan eficazmente BDA-SIINFEKL a los linfocitos T específicos del epítipo de SIINFEKL

Los inventores caracterizaron la capacidad de EDA-SIINFEKL de ser capturada por las CPA para presentarse al epítipo SIINFEKL del LTC procesado a los linfocitos T de los ratones transgénicos OT-1, específicos de este epítipo. Se cultivaron CD derivadas de médula ósea (10^5 células/pocillo) en presencia de diferentes concentraciones de EDA-SIINFEKL, EDA + SIINFEKL, EDA o péptido SIINFEKL. Cuarenta y ocho horas después, se añadieron 10^5 células OT-1 no adherentes. Se midió la producción de IFN- γ por células no adherentes OT-1 (Figura 6A). El péptido SIINFEKL se presentó eficazmente a los linfocitos T de los ratones OT-1 tal como se ha probado mediante la producción de IFN- γ . EDA-SIINFEKL induce también altos niveles de IFN- γ , aunque son necesarias elevadas dosis de la proteína para obtener niveles similares o incluso mayores de IFN- γ , indicando claramente que la proteína EDA transporta el epítipo SIINFEKL a las moléculas MHC de tipo I. La adición de la proteína EDA a la CD incubadas con el péptido SIINFEKL no aumenta la producción de IFN- γ por los linfocitos T a partir de ratones OT-1. Tal como se esperaba, las CD incubadas solo con EDA no activan los linfocitos T de los ratones OT-1. Para analizar si la expresión de la molécula TLR4 en CD podría potenciar la presentación de EDA-SIINFEKL, se incubaron células B3Z específicas de SIINFEKL con diferentes concentraciones de EDA-SIINFEKL en presencia de esplenocitos de ratones C57BL/6 silvestres o RLT4 KO. La presentación de EDA-SIINFEKL a células B3Z fue más eficaz en presencia de células presentadoras de antígeno que expresaban TLR4 (Figura 6B). También, la presentación de EDA-SIINFEKL a las células B3Z se bloqueó completamente mediante la adición de anticuerpos dirigidos contra RLT4 (Figura 6C), sugiriendo que TLR4 está implicado en la captura de EDA-SIINFEKL. Posteriormente, los investigadores estudiaron el efecto de diferentes fármacos en el procesamiento de EDA-SIINFEKL y encontraron que esta presentación estaba totalmente inhibida por la monensina, brefeldina A o cicloheximida pero no por cloroquina, un conocido inhibidor de la acidificación en endosomas y lisosomas tardíos (Figura 6D). Tal como se esperaba, la presentación del péptido sintético SIINFEKL no se vio afectada por estos fármacos. Estos datos sugieren que la internalización de EDA-SIINFEKL no está medida por la macropinocitosis y demuestran que EDA-SIINFEKL se procesa mediante la ruta de procesamiento citosólico de tipo I.

2.2.4. EDA-SIINFEKL induce los linfocitos T específicos de SIINFEKL *in vivo*

Los resultados precedentes demuestran que la proteína EDA-SIINFEKL recombinante es bioactiva y activa específicamente las CPA. La inducción de las respuestas inmunes de los linfocitos T específicos es crítica para el

desarrollo de una vacuna. De esta manera, los inventores probaron si los ratones inmunizados con la proteína de células EG70VAfusión EDA-SIINFEKL desarrollaron respuestas específicas a los LTC frente a las células diana sometidas a pulso con el epítipo de SIINFEKL. Se inmunizaron ratones C57BL6 i.v. con 50 µg de EDA-SIINFEKL o con SIINFEKL en PBS en los días 0 y 10. En el día 20, se sacrificaron los ratones para el análisis de la respuesta de los LTC frente a SIINFEKL. Se encontró que EDA-SIINFEKL era capaz de inducir la LTC frente a las células diana EL-4 sometidas a pulso con SIINFEKL. Por otra parte, no se encontró actividad de LTC cuando se inmunizaron los ratones solo con SIINFEKL (Figura 7). Debido a la capacidad de EDA de inducir la maduración *in vivo* de las células dendríticas, Se analizó la capacidad de EDA de actuar como un adyuvante cuando se inmunizó con la proteína OVA. En este experimento, los inventores observaron que la presencia de EDA en la mezcla de inmunización tenía un efecto inmunoestimulador y es capaz de potenciar la inducción de la respuesta de los LTC frente a SIINFEKL inducida por la proteína OVA (comparar la actividad lítica entre los paneles A y B de la figura 9).

2.2.5. EDA-SIINFEKL protege a los ratones del estímulo con células tumorales que expresan la proteína OVA

Para estudiar la capacidad de la proteína de fusión EDA-SIINFEKL de proteger a los ratones frente a la inyección de células tumorales EG70VA, se inmunizaron los ratones s.c. con 3 nmol de EDA-SIINFEKL, SIINFEKL o con solución salina. Se estimularon los ratones veinte días después de la segunda inmunización s.c. con 10^5 . Los inventores encontraron que la inmunización de EDA-SIINFEKL protege a los ratones del crecimiento tumoral. Todos los ratones inmunizados con SIINFEKL o con solución salina desarrollaron tumores, mientras que un 40% de ratones inmunizados con EDA-SIINFEKL permanecieron exentos de tumores y el 60% restante experimentó un retardo del crecimiento tumoral (Figura 8).

2.3. Discusión

En el presente estudio, usando la proteína EDA recombinante como un vector de liberación de epítipo, los inventores establecieron una estrategia para la inmunización que prima las respuestas de los LTC *in vivo*, derivándose en la necesidad de un adyuvante. Los inventores identificaron los mecanismos que contribuyen a la eficacia de las proteínas de fusión que contienen EDA como un vector para liberar antígenos a células que expresan TLR-4 y para inducir respuestas inmunes celulares frente a un antígeno.

En primer lugar, los inventores encontraron que la estimulación *in vitro* de BMDC con EDA era capaz de estimular la producción de citosinas proinflamatorias tales como IL-12 y TNF-α. Estas citocinas son conocidas por ser cruciales para el inicio de una fuerte respuesta inmune frente a un antígeno. Además, se encontró que la inmunización *in vivo* con EDA era capaz de inducir la maduración de las CD y aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las CD. La expresión de estas moléculas coestimuladoras es de capital importancia para la inducción eficaz de respuestas inmunes frente a un antígeno. Se ha encontrado que este efecto es dependiente de la presencia de RLT4, debido a que las células CD11c aisladas *in vivo* a partir de ratones C57BL/6 RLT4 KO previamente inmunizados con EDA no muestra ninguna mejora sobre su estado de maduración en comparación en comparación con las encontradas en animales no inmunizados.

Los inventores encontraron que la presencia de la molécula de RLT4 en CPA mejora la presentación del antígeno tras la incubación con la proteína de fusión EDA-SIINFEKL y que esta presentación no estaba afectada por la cloroquina, que inhibe la proteólisis endolisosomal. Estos datos sugieren que la internalización de EDA-SIINFEKL no está mediada por la macropinocitosis y demuestran que la proteína EDA-SIINFEKL recombinante se procesa como un antígeno citosólico, e implica que la proteína de fusión ha de liberarse al citosol a través de la membrana plasmática de la CPA.

Y lo más importante, los inventores han encontrado que la inmunización de ratones con la proteína de fusión recombinante EDA-SIINFEKL es capaz de inducir *in vivo* una respuesta de los LTC específica frente al epítipo de SIINFEKL. Además, la inmunización con EDA-SIINFEKL es capaz de proteger a los ratones frente al estímulo con células tumorales EG70VA. Todos estos datos muestran que este vector proteínico que contiene EDA es capaz de: (i) dirigir antígenos a células que expresan RLT4 y en particular CPA profesionales; (ii) liberar el antígeno vectorizado a la ruta de procesamiento del antígeno clásico de Tipo I; (iii) inducir la maduración de células dendríticas *in vivo* e *in vitro*; y (iv) primar la LTC *in vivo* frente al antígeno vectorizado en ausencia de adyuvante y, de esta manera, se puede usar en estrategias de vacunación frente a agentes infecciosos o frente a cáncer. También, estas proteínas de fusión que contienen EDA pueden servir para la liberación citosólica de moléculas farmacéuticamente relevantes a las células que expresan RLT4. Adicionalmente, la capacidad de EDA para inducir la maduración *in vivo* de células dendríticas permite su uso como un adyuvante en formulaciones que contienen un antígeno frente al que se desea producir una respuesta inmunógena, abriendo el espectro de posibilidades para el uso de EDA en el desarrollo de vacunas.

Ejemplo 3. Se puede usar la proteína EDA como un vehículo para transportar antígenos de al menos 390 aminoácidos

3.1. Materiales y procedimientos

3.1.1. Expresión de proteínas recombinantes EDA-OVA y EDA-NS3

Para la construcción de un plásmido de expresión EDA-OVA, se extrajo el ARNm de células tumorales EG70VA, que expresan la proteína OVA. Tras la transcripción inversa y la amplificación mediante la PCR con los cebadores GCGGCCCAATGGGCTCCATCGGCGCA (SEQ ID NO: 16) y GCGGCCGCAGGGGAAACACATCT (SEQ ID NO: 17) (se añadieron las bases subrayadas para introducir la secuencias reconocidas por la enzima de restricción NotI, mientras que la secuencia en cursiva pertenece al inicio y al final de la ovoalbúmina). Se clonó el producto de la PCR en pCR2.1-TOPO usando el kit TOPO TA (Invitrogen), se digirió con NotI y se subclonó en el plásmido pET20EDA 1.2 (que expresa la proteína EDA) anteriormente digerida con NotI. Se verificó la orientación correcta de la construcción mediante secuenciación. Tras la inducción de *E. coli* transformada con los cultivos de los plásmidos, se purificó la proteína de fusión presente en la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad (HisTrap, Pharmacia) utilizando una plataforma FPLC (AKTA, Pharmacia). Se desaló la proteína con columnas de desalación Hitrap (Pharmacia), y se concentró con el dispositivo de filtración mediante centrifugación con Amicon Ultra 4-5000 MWCO (Millipore Carrighwahill, Irlanda). El vector de proteína recombinante se purificó usando columnas de endotoxina Endotrap (Profos Ag, Regensburg, Alemania), hasta que los niveles de endotoxina estuvieron por debajo de 0,2 UE/μg de proteína (medida mediante el ensayo LAL, Cambrex). Para la construcción de la proteína EDA-NS3 se siguió una estrategia similar usando los cebadores AGCGGCCGCAGCCACCATGGCGCCTATCACGGCCTA TTC (SEQ ID NO: 18) y AGCGGCCGCTTGCGGTACGGCCGAGGGGATGAGTT (SEQ ID NO: 19) que permiten la expresión del fragmento amino terminal de la proteína NS3 (aminoácidos 1026-1221). En contraste con la proteína EDA-OVA que se extrajo a partir de la fracción soluble de las fracciones de *E. coli*, en el caso de la proteína EDA-NS3, la proteína se purificó a partir de los cuerpos de inclusión previamente disueltos en urea 8 M. Después de una cromatografía de afinidad usando columnas HisTrap, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico (DEAE-sefarsa). La fracción purificada a partir de esta segunda cromatografía se replegó siguiendo un protocolo de repliegue en una columna G25. Una vez replegada, la columna EDA-NS3 se desaló y purificó de endotoxinas usando columnas Endotrap (Profos, Alemania).

Las proteínas purificadas de esta manera se analizaron mediante SDS-PAGE

3.1.2. Estudios *in vitro* para evaluar la capacidad de presentación de antígeno

Se evaluó la capacidad de EDA-OVA de ser capturada por las CPA y la posterior presentación del epítipo de SIINFELK de los LTC procesado a los linfocitos T a partir de ratones transgénicos OT-1. Se cultivaron células dendríticas derivadas de médula ósea (10^5 células/pocillo) en presencia de diferentes concentraciones de EDA-OVA, EDA + OVA (unidas o covalentemente), OVA o EDA. 12 h después, se añadieron 10^5 células/pocillo de células no adherentes procedentes de ratones OT-1. A las 24 horas del inicio del cultivo se extrajo el sobrenadante para la cuantificación de IFN-γ mediante un ensayo ELISA comercial.

3.1.3. Medida de la inducción de linfocitos T citotóxicos (LTC) *in vivo* y células productoras de IFN-γ después de la inmunización

Se inmunizaron ratones C57BL6 o HHD (Transgénico para la molécula HLA-A2.1) i.v. con 50 μg de EDA-OVA o EDA-NS3 respectivamente, en los días 0 y 10. En el día 20 se sacrificaron los ratones para determinar la respuesta de los LTC frente a SIINFELK o frente al péptido NS3 1073. Se cultivaron esplenocitos de animales inmunizados en presencia de 0,1 μg/ml de SIINFELK o de 1 μg/ml de NS3 1073 a 5×10^6 células/ml (10 ml) durante 5 días en medio completo. En el día 5, se recogieron las células para el análisis de liberación del cromo. Se midió la actividad lítica incubando para 4 diferentes cantidades de células efectoras con 1×10^4 células diana EL-4, previamente cargadas con ^{51}Cr con o sin péptido. Se calculó el porcentaje de lisis específico de acuerdo con la fórmula $(\text{cpm experimental} - \text{cpm espontánea}) / (\text{cpm máxima} - \text{cpm espontánea}) \times 100$, en el que la lisis espontánea corresponde a células diana incubadas en ausencia de células efectoras, y la lisis máxima se obtiene incubando células diana con Triton x 100 al 5%.

Para medir la producción de IFN-γ en respuesta a diferentes péptidos, se dispensaron esplenocitos de ratones inmunizados en placas de 96 pocillos, 8×10^5 células/pocillo, solo con medio completo, o con 30 μM de péptidos NS3 1038-1046 (SEQ ID NO: 23), 1073-1081 (SEQ ID NO: 20, CVNGVCWTV), 1169-1177 (SEQ ID NO: 22), o con 1 μg/ml de NS3 recombinante en un volumen final de 0,25 ml. Se recuperaron los sobrenadantes (50 μl) después de 48 h y se midió el IFN-γ mediante ELISA (Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.1.4. Protección frente a la infección por el virus vaccinia vHCV 1-1031 que expresa poliproteína del virus de la hepatitis C

Se inmunizaron C57BL/6 los días 1 y 10 con 1×10^6 células dendríticas derivadas de médula ósea sometidas a pulso con proteína EDA-NS3. Diez días después de la segunda inmunización, se infectaron los ratones vía i.p. con 5×10^6 ufp de virus vaccinia vHCV 1-1031. Tres días después de la infección, se sacrificaron los animales y se cuantificó la carga vírica/mg del tejido ovárico mediante un ensayo de cuantificación de las unidades formadoras de

placas basado en el uso de la línea celular BSC-1.

3.2. Resultados

3.2.1. Expresión y purificación de proteínas EDA-OVA y BDA-NS3

Tal como se indicó en la sección de materiales y procedimientos, EDA-OVA o EDA-NS3 se purificaron a partir de extractos de *E. coli* transformados usando la fracción soluble en el caso de EDA-OVA y forman cuerpos de inclusión en el caso de EDA-NS3. En las figuras 10A y 11A se muestra el resultado de SDS-PAGE para ambas. Se obtuvieron bandas sencillas correspondientes a las proteínas de tamaños de 55 kDa y 32 kDa correspondientes respectivamente a los tamaños esperados de estas proteínas.

3.2.2. La unión de EDA a la proteína OVA potencia la presentación del antígeno de IVA a los linfocitos T de ratones transgénicos OT-1

Los inventores analizaron la capacidad de unión de EDA a la proteína OVA para potenciar la presentación del antígeno del epítipo de SIINFEKL a los linfocitos T específicos de este epítipo. Los inventores observaron que las células dendríticas derivadas de médula ósea cultivadas en presencia de EDA-OVA estimularon una producción más fuerte de IFN- γ por las células no adherentes de ratones OT-1 que indujeron cantidades equimoleculares solo de proteína OVA (Figura 9B). Los inventores observaron que la producción de IFN- γ fue también potenciada en cultivos simultáneos que contenían la proteína EDA y la proteína OVA, cuando se compararon solo con la proteína OVA, sugiriendo que la maduración de las CD inducida por EDA podría potenciar la activación de los linfocitos T.

3.2.3. La unión de EDA a la proteína OVA o a la proteína NS3 potencia la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos *in vivo*

Se analizó la capacidad de EDA-OVA y de EDA-NS3 de inducir una respuesta de los LTC frente al epítipo de SIINFEKL o frente al epítipo de NS3 1073, respectivamente. Los inventores observaron, para la proteína EDA-OVA, que la inmunización con esta proteína disuelta en solución salina fue capaz de inducir una respuesta citotóxica frente a las células diana incubadas con el péptido SIINFEKL, que la inmunización solo con la proteína OVA no es capaz de la inducción (Figura 9C). De la misma manera, la inmunización de ratones HHD (transgénicos para HLA-A2.1) con la proteína EDA-NS3 induce una respuesta citotóxica eficaz frente a las células diana previamente incubadas con el péptido NS3 1073 (V) (SEQ ID NO: 20, CVNGNCWTV), o con la variante 1073 (L) de este péptido (SEQ ID NO: 21, CLNGVCWTV) (Figura 11B). Los inventores observaron que la inmunización de ratones HHD con la proteína EDA-NS3 induce la activación de las células productoras de IFN- γ específicas de los péptidos NS3 1038 (SEQ ID NO: 23), 1073 (SEQ ID NO: 20, CVNGVCWTV) y 1169 (SEQ ID NO: 22) (Figura 11C). Además, la inmunización de ratones con la proteína EDA-NS3 induce una respuesta celular citotóxica duradera específica frente al péptido NS3 1073. En efecto, cuando los ratones inmunizados con la proteína EDA-NS3 se sacrificaron 60 días después de la inmunización, los inventores detectaron la presencia de LTC específicos de este péptido (Figura 11D).

3.2.4. La Inmunización de ratones C57BL/6 con células dendríticas incubadas con la proteína EDA-NS43 protege a los ratones frente a la infección por un virus vaccinia que expresa proteínas del virus de la hepatitis C

Los inventores deseaban estudiar si la inmunización con células dendríticas incubadas *in vitro* con la proteína EDA-NS3 era capaz de inducir una respuesta celular capaz de proteger a los ratones frente al estímulo con un virus recombinante que expresaba las proteínas del virus de la hepatitis C. Por esta razón, los inventores inmunizaron ratones C57/BL6 con células dendríticas derivadas de médula ósea incubadas con la proteína EDA-NS3 o con células dendríticas que no se habían incubado previamente con ningún antígeno. Diez días después de la segunda inmunización, se infectaron los ratones con 5×10^6 ufp de virus vaccinia vHCV 1-3011 (un amable regalo del Dr Rice Washington University School of Medicine, San Luis, MO y descrito por Grakoui A, y col. J Virol. 1993; 67: 1385). Tres días después se midió la carga vírica en ambos grupos de ratones. En este experimento los inventores observaron que la inmunización con CD incubadas con proteína EDA-NS3 era capaz de proteger un 6% de ratones frente a las infecciones por virus vaccinia recombinante.

3.3. Discusión

Tal como se ha demostrado en resultados anteriores, la proteína EDA puede servir como un vector útil para dirigir el epítipo de SIINFEKL desde la proteína OVA a las células que expresan la molécula de RLT4 y potenciar su inmunogenicidad. Para evaluar la capacidad de EDA para aumentar la inmunogenicidad de proteínas más grandes, los inventores construyeron las proteínas recombinantes de la fusión de EDA-OVA que contenían OVA completa (397 aminoácidos) y la proteína EDA-NS3 que contiene el fragmento con actividad proteasa de la proteína NS3 del virus de la hepatitis C.

Estos resultados que la proteína EDA puede actuar como un vector muy eficaz para dirigir antígenos más grandes. De esta manera, los inventores encontraron que en los ensayos de presentación del antígeno, la unión de OVA a EDA potencia la captura del antígeno por las células presentadoras de antígeno, activando la activación de los

linfocitos T específicos. También, los inventores observaron que la inmunización con estas proteínas de fusión (EDA-OVA y EDA-NS3) permite la inducción de respuestas citotóxicas específicas frente a estos antígenos. Estas respuestas inducidas fueron de larga duración. Finalmente, los inventores observaron que la administración de la proteína EDA-NS3 con células dendríticas permite la inducción de una respuesta celular protectora frente a la infección por el virus vaccinia que expresa las proteínas del virus de la hepatitis C.

Estos datos indican que la proteína EDA puede ser un vector de proteína muy adecuado para la inducción de respuestas celulares frente a un antígeno de interés. La construcción de proteínas de fusión basadas en proteínas EDA es una estrategia adecuada en los protocolos de vacunación frente a enfermedades tumorales o enfermedades producidas por agentes infecciosos.

Listado de secuencias

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.

<120> AGENTES Y PROCEDIMIENTOS BASADOS EN EL USO DEL DOMINIO EDA DE FIBRONECTINA

<130> 1.2006.0176/ZAR

<150> ES200501412

<151> 13-06-2005

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 348

<212> ADN

<213> Vector proteináceo recombinante

<400> 1

```

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa    60
attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggtgaccta ctcgagccct    120
gaggatggaa tccgggagct tttccctgca cctgatgggtg aagacgacac tgcagagctg    180
cagggcctca ggccgggggtc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg    240
gagagccagc ccctgattgg aatccagtc acacagcttg agagtataat caactttgaa    300
aaactgactg aatgggcggc cgcactcgag caccaccacc accaccac                348

```

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Vector proteináceo recombinante

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(116)

<223> Vector proteináceo recombinante mEDA-SIINFEKL-6xHis (EDA-SIINFEKL), codificado por la secuencia SEQ. ID. NO.: 1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(91)

<223> Dominio EDA de fibronectina de ratón (mEDA)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(105)

<223> Péptido QLE-SIINFEKL-TEW

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(116)

<223> Cola de histidina 6xHis

<400> 2

ES 2 392 659 T3

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
 1 5 10 15
 Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe
 35 40 45
 Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg
 50 55 60
 Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met
 65 70 75 80
 Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Gln Leu Glu Ser Ile
 85 90 95
 Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Ala Ala Ala Leu Glu His His
 100 105 110
 His His His His
 115

<210> 3

<211> 255

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

aacattgata gccctaaagg actggcattc actgatgtgg atgtcgattc catcaaaatt 60
 gcttgggaaa gccacaggg gcaagtttcc aggtacaggg tgacctactc gagccctgag 120
 gatggaatcc atgagctatt ccctgcacct gatggtgaag aagacactgc agagctgcaa 180
 ggcctcagac cgggttctga gtacacagtc agtgtggttg ccttgcacga tgatatggag 240
 agccagcccc tgatt 255

<210> 4

<211> 85

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
 35 40 45
 Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
 50 55 60
 Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
 65 70 75 80
 Ser Gln Pro Leu Ile
 85

<210> 5

15 <211> 246

<212> ADN

<213> Vector proteináceo recombinante

<400> 5

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttactgatg tggatgtcga ttccatcaaa 60
 attgcttggg aaagcccaca ggggcaagt tccaggtaca gggcctcagg ccgggggtctg 120
 agaacacagt cagtgtggtt gccttgacg atgatatgga gagccagccc ccagcttgag 180
 agtataatca actttgaaaa actgactgaa tgggcggtcg cactcgagca ccaccaccac 240
 caccac 246
 <210> 6
 <211> 82
 <212> PRT
 5 <213> Vector proteináceo recombinante
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (82)
 <223> Vector proteináceo recombinante mEDAalt-SIINFEKL-6xHis, codificado por la secuencia SEQ. ID. NO.: 5
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (57)
 <223> Dominio EDA alternativo dx fibronectina de ratón (mEDAalt), generado por corte y empalme alternativo
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (58) .. (71)
 <223> Péptido QLE-SIINFEKL-TEW
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (77) .. (82)
 <223> Cola de histidina
 <400> 6

 Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
 1 5 10 15

 Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 20 25 30

 Tyr Arg Ala Ser Gly Arg Gly Leu Arg Thr Gln Ser Val Trp Leu Pro
 35 40 45

 Cys Thr Met Ile Trp Arg Ala Ser Pro Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn
 50 55 60

 Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Ala Val Ala Leu Glu His His His His
 65 70 75 80

 His His
 <210> 7
 25 <211> 168
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

 aacattgatc gccctaaagg actggcattc actgatgtgg atgtcgattc catcaaaatt 60
 gcttgggaaa gccacaggg gcaagtttcc aggtacaggg cctcagaccg ggttctgagt 120
 acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccc 168
 30 <210> 8
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Arg Ala Ser Asp Arg Val Leu Ser Thr Gln Ser Val Trp Leu Pro Cys
 35 40 45
 Thr Met Ile Trp Arg Ala Ser Pro
 50 55

<210> 9

<211> 909

<212> ADN

5 <213> Vector proteináceo recombinante

<400> 9

```

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa    60
attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggtagaccta ctcgagccct    120
gaggatggaa tccgggagct tttccctgca cctgatggtg aagacgacac tgcagagctg    180
cagggcctca ggccggggtc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg    240
gagagccagc ccctgattgg aatccagtcc acagcggccg cagccaccat ggcgcctatc    300
acggcctatt cccaacaaac gcggggcctg cttggctgta tcatcactag cctcacaggt    360
cgggacaaga accaggtcga tggggagggt caggtgctct ccaccgcaac gcaatctttc    420
ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg accgtctacc atggtgccgg ctcgaagacc    480
ctggccggcc cgaagggtcc aatcacccaa atgtacacca atgtagacca ggacctcgtc    540
ggctggccgg cgccccccgg ggcgcgctcc atgacaccgt gcacctgcgg cagctcggac    600
ctttacttgg tcacgaggca tgccgatgtc attccggtgc gccggcgagg cgacagcagg    660
gggagtctac tctcccctag gcccgctctc tacctgaagg gctcctcggg tggaccactg    720
ctttgccctt cggggcacgt tgtaggcata ttccgggctg ctgtgtgcac ccgggggggt    780
gcgaaggcgg tggacttcat acccgttgag tctatggaaa ctacatgcg gtctccgggtc    840
ttcacagaca actcatcccc tccggccgta ccgcaagcgg ccgcactcga gcaccaccac    900
caccaccac                                     909
  
```

<210> 10

<211> 303

10 <212> PRT

<213> Vector proteináceo recombinante

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(303)

15 <223> Vector proteináceo recombinante mEDA-NS3-6xHis (EDA-NS3), codificado por la secuencia SEQ. ID. NO.: 9

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(91)

<223> Dominio EDA de fibronectina de ratón (mEDA)

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(292)

<223> Proteína NS3 del virus de la hepatitis C

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (298)..(303)

<223> Cola de histidina

<400> 10

ES 2 392 659 T3

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
1 5 10 15
Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
20 25 30
Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe
35 40 45
Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg
50 55 60
Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met
65 70 75 80
Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ala Ala Ala Thr
85 90 95
Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
100 105 110
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly
115 120 125
Glu Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
130 135 140
Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
145 150 155 160
Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
165 170 175
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr
180 185 190
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
195 200 205
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
210 215 220
Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
225 230 235 240
Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
245 250 255
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met
260 265 270
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro
275 280 285
Ala Val Pro Gln Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
290 295 300

<210> 11

<211> 1473

5 <212> ADN

<213> Vector proteináceo recombinante

<400> 11

```

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa    60
attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca ggggtgacct ctcgagccct    120
gaggatggaa tccggggagct tttccctgca cctgatgggtg aagacgacac tgcagagctg    180
cagggcctca ggccgggggtc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg    240
gagagccagc ccctgattgg aatccagtcc acagcggccg caatgggctc catcggcgca    300
gcaagcatgg aattttgttt tgatgtattc aaggagctca aagtccacca tgccaatgag    360
aacatcttct actgccccat tgccatcatg tcagctctag ccatgggtata cctgggtgca    420
aaagacagca ccaggacaca gataaataag gttgttcgct ttgataaact tccaggattc    480
ggagacagta ttgaagctca gtgtggcaca tctgtaaacg ttcactcttc acttagagac    540
atcctcaacc aaatcaccaa accaaatgat gtttattcgt tcagccttgc cagtagactt    600
tatgtgaag agagataccc aatcctgcca gaatacttgc agtgtgtgaa ggaactgtat    660
agaggaggct tggaacctat caactttcaa acagctgcag atcaagccag agagctcatc    720
aattcctggg tagaaagtca gacaaatgga attatcagaa atgtccttca gccaaagctcc    780

gtggattctc aaactgcaat ggttctggtt aatgccattg tcttcaaagg actgtgggag    840
aaaacattta aggatgaaga cacacaagca atgcctttca gagtgaactga gcaagaaagc    900
aaacctgtgc agatgatgta ccagattggt ttatttagag tggcatcaat ggcttctgag    960
aaaatgaaga tcctggagct tccatttgcc agtgggacaa tgagcatgtt ggtgctgttg    1020
cctgatgaag tctcaggcct tgagcagctt gagagtataa tcaactttga aaaactgact    1080
gaatggacca gttctaattg tatggaagag aggaagatca aagtgtactt acctcgcatg    1140
aagatggagg aaaaatacaa cctcacatct gtcttaattg ctatgggcat tactgacgtg    1200
tttagctctt cagccaatct gtctggcatc tcctcagcag agagcctgaa gatattctcaa    1260
gctgtccatg cagcacatgc agaaatcaat gaagcaggca gagaggtggt agggtcagca    1320
gaggctggag tggatgtctc aagcgtctct gaagaattta gggctgacca tccattcctc    1380
ttctgtatca agcacatgc aaccaacgcc gttctcttct ttggcagatg tgtttcccct    1440
gcggccgcac tcgagacca ccaccaccac cac                                1473

```

<210> 12

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Vector proteináceo recombinante

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(491)

10 <223> vector proteináceo recombinante mEDA-OVA-6xHis (EDA-OVA), codificado por la secuencia SEQ. ID. NO.:

11

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(91)

15 <223> Dominio EDA de fibronectina de ratón (mEDA)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (95)..(480)

<223> Proteína OVA

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (486)..(491)

<223> Cola de histidina

<400> 12

ES 2 392 659 T3

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
 1 5 10 15
 Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe
 35 40 45
 Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg
 50 55 60
 Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met
 65 70 75 80
 Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ala Ala Met Gly
 85 90 95
 Ser Ile Gly Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe Lys Glu
 100 105 110
 Leu Lys Val His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro Ile Ala
 115 120 125
 Ile Met Ser Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp Ser Thr
 130 135 140
 Arg Thr Gln Ile Asn Lys Val Val Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly Phe
 145 150 155 160
 Gly Asp Ser Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val His Ser
 165 170 175
 Ser Leu Arg Asp Ile Leu Asn Gln Ile Thr Lys Pro Asn Asp Val Tyr
 180 185 190
 Ser Phe Ser Leu Ala Ser Arg Leu Tyr Ala Glu Glu Arg Tyr Pro Ile
 195 200 205
 Leu Pro Glu Tyr Leu Gln Cys Val Lys Glu Leu Tyr Arg Gly Gly Leu
 210 215 220
 Glu Pro Ile Asn Phe Gln Thr Ala Ala Asp Gln Ala Arg Glu Leu Ile
 225 230 235 240

ES 2 392 659 T3

Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg Asn Val Leu
245 250 255
Gln Pro Ser Ser Val Asp Ser Gln Thr Ala Met Val Leu Val Asn Ala
260 265 270
Ile Val Phe Lys Gly Leu Trp Glu Lys Thr Phe Lys Asp Glu Asp Thr
275 280 285
Gln Ala Met Pro Phe Arg Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Pro Val Gln
290 295 300
Met Met Tyr Gln Ile Gly Leu Phe Arg Val Ala Ser Met Ala Ser Glu
305 310 315
Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met Ser Met
325 330 335
Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser
340 345 350
Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn Val Met
355 360 365
Glu Glu Arg Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met Glu Glu
370 375 380
Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr Asp Val
385 390 395 400
Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu Ser Leu
405 410 415
Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala
420 425 430
Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala Ala Ser
435 440 445
Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys Ile Lys
450 455 460
His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val Ser Pro
465 470 475 480
Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
485 490

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Oligonucleótido sintético

<400> 13

ccatatgaac attgatcgcc ctaaaggact 30

<210> 14

<211> 75

10 <212> ADN

<213> Oligonucleótido sintético

<400> 14

agcggccgcc cattcagtc gtttttcaaa gttgattata ctctcaagct gtgtggactg

60

gattccaatc agggg

75

<210> 15

15 <211> 33

<212> ADN

<213> Oligonucleótido sintético

<400> 15

agcggccgct gtggactgga ttcaatcag ggg 33
 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Oligonucleótido sintético
 <400> 16
 gcggccgcaa tgggtccat cggcgca 27
 <210> 17
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Oligonucleótido sintético
 <400> 17
 gcggccgcag gggaacaca tct 23
 <210> 18
 15 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Oligonucleótido sintético
 <400> 18
 agcggccgca gccacatgg cgcctatcac ggcctattc 39
 20 <210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Oligonucleótido sintético
 <400> 19
 25 agcggccgct tgcgtacgg ccggagggga tgagtt 36
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Péptido sintético
 30 <400> 20
 Cys val Asn Gly val Cys Trp Thr val
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Péptido sintético
 <400> 21
 Cys Leu Asn Gly val Cys Trp Thr val
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Péptido sintético
 <400> 22
 Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala val
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Péptido sintético
 <400> 23
 Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser
 1 5
 50

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

a) dominio EDA de fibronectina (EDA), o

b) un fragmento de dicho dominio EDA capaz de unirse a TLR4, en la fabricación de una composición farmacéutica estimuladora de una respuesta celular inmune frente a un antígeno, en el que dicha composición farmacéutica es una composición de adyuvante inmunoestimulador o una vacuna.

2. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el fragmento que corresponde al dominio EDA comprende una secuencia seleccionada entre:

a) aminoácidos 2-91 de la SEQ. ID. NO: 2;

b) SEQ. ID. NO: 4; y

c) un fragmento de las secuencias a) y b) capaz de unirse a las células que expresan RLT4.

3. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el fragmento que corresponde al dominio EDA comprende una secuencia seleccionada entre:

a) aminoácidos 2-57 de la SEQ. ID. NO: 6;

b) SEQ. ID. NO: 8; y

c) un fragmento de las secuencias a) y b) capaz de unirse a las células que expresan RLT4.

4. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha composición farmacéutica comprende además una o más moléculas de interés.

5. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el polipéptido y la molécula de interés se unen entre sí en el mismo vector proteínaceo; y en el que dicha molécula de interés se selecciona a partir de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno parasítico, un antígeno tumoral, un determinante antigénico tumoral, y un alérgeno.

6. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho antígeno es un antígeno vírico.

7. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque dicho antígeno es un antígeno vírico procedente del virus de la hepatitis C.

8. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho antígeno es un antígeno tumoral o un determinante antigénico tumoral.

9. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad infecciosa, tumoral, o una enfermedad alérgica.

10. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad infecciosa.

11. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es para el tratamiento y la profilaxis de la hepatitis C.

12. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es para el tratamiento y la profilaxis de una enfermedad tumoral.

13. un vector proteínaceo caracterizado porque este comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre:

a) un dominio EDA de fibronectina (EDA), o

b) un fragmento de dicho dominio EDA capaz de unirse a RLT4,

unido a una molécula de interés seleccionada entre: un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico,

un antígeno parasítico, un antígeno tumoral, y un determinante antigénico tumoral.

14. Un vector proteináceo de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque dicho dominio EDA comprende una secuencia seleccionada entre:

a) los aminoácidos 2-91 de la secuencia SEQ. ID. NO: 2;

b) la secuencia SEQ. ID. NO: 4; y

c) un fragmento de las secuencias a) y b) capaz de unirse a las células que expresan RLT4.

15. Un vector proteináceo de acuerdo a la reivindicación 13, caracterizado porque dicho dominio EDA comprende una secuencia seleccionada entre:

a) los aminoácidos 2-57 de la SEQ. ID. NO: 6;

b) la SEQ. ID. NO: 8; y

c) un fragmento de las secuencias a) y b) capaz de unirse a las células que expresan RLT4.

16. Un vector proteináceo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque dicha molécula de interés es un antígeno vírico.

17. Un vector proteináceo de acuerdo con la reivindicación 16 caracterizado porque dicha molécula de interés es un antígeno vírico procedente del virus de la hepatitis C.

18. Un vector proteináceo de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque dicho antígeno del virus de la hepatitis C es la proteína NS3 o un fragmento antigénico de dicha proteína.

19. un vector proteináceo de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque dicha secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 10.

20. Un vector proteináceo de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque dicha molécula de interés se selecciona entre un antígeno tumoral y un determinante antigénico tumoral.

21. Un ácido nucleico modificado caracterizado porque este codifica un vector proteináceo definido en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

22. Un ácido nucleico modificado de acuerdo con la reivindicación 21 caracterizado porque este comprende también una secuencia control unida operativamente que regula la expresión del vector proteináceo.

23. Un ácido nucleico modificado de acuerdo con las reivindicaciones 21 o 22, caracterizado porque este comprende la SEQ. ID. NO: 1, o la SEQ. ID. NO: 5.

24. Un ácido nucleico modificado de acuerdo con las reivindicaciones 21 o 22, caracterizado porque este comprende la SEQ ID NO: 9.

25. Un vector de expresión para la expresión génica de un vector proteináceo definido en cualquiera de las reivindicaciones 13-20, caracterizado porque dicho vector de expresión comprende un ácido nucleico modificado definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24.

26. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizado porque dicho vector es un vector vírico.

27. Una célula hospedadora de expresión caracterizada porque esta comprende un ácido nucleico modificado definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, o un vector de expresión definido en las reivindicaciones 25 o 26.

28. Una célula hospedadora de expresión de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizada porque dicha célula hospedadora de expresión es *Escherichia coli*.

29. Un procedimiento para la producción de un vector proteináceo definido en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, caracterizado porque este comprende cultivar una célula hospedadora de expresión definida en las reivindicaciones 27 o 28 en condiciones que permiten la producción de dicho vector proteináceo y la recuperación del mismo.

30. Uso de un ácido nucleico modificado definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, un vector de expresión definido en las reivindicaciones 25 o 26, o una célula hospedadora definida en las reivindicaciones 27 o 28, en la preparación de una composición farmacéutica.

5 31. Una composición farmacéutica caracterizada porque esta comprende al menos un vehículo farmacéutico aceptable, y al menos uno de los siguientes componentes:

i) un vector proteináceo definido en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20;

10 ii) un ácido nucleico modificado definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24;

iii) un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico modificado definido en las reivindicaciones 25 o 26; o

15 iv) una célula hospedadora de expresión que comprende también dicho ácido nucleico modificado, definido en las reivindicaciones 27 o 28.

32. Una composición farmacéutica caracterizada porque esta comprende una cantidad de células dendríticas, en la que dichas células dendríticas se han incubado *in vitro* con al menos uno de los siguientes componentes:

20 i) un vector proteináceo definido en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20;

ii) un ácido nucleico definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24; o

iii) un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico modificado definido en las reivindicaciones 25 o 26.

25 33. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 31 o 32, caracterizada porque la composición es una vacuna o una composición inmunoterapéutica.

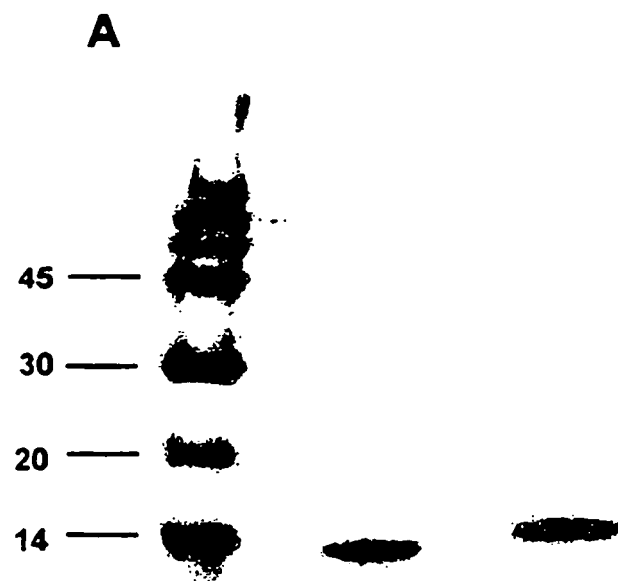


Figura 1

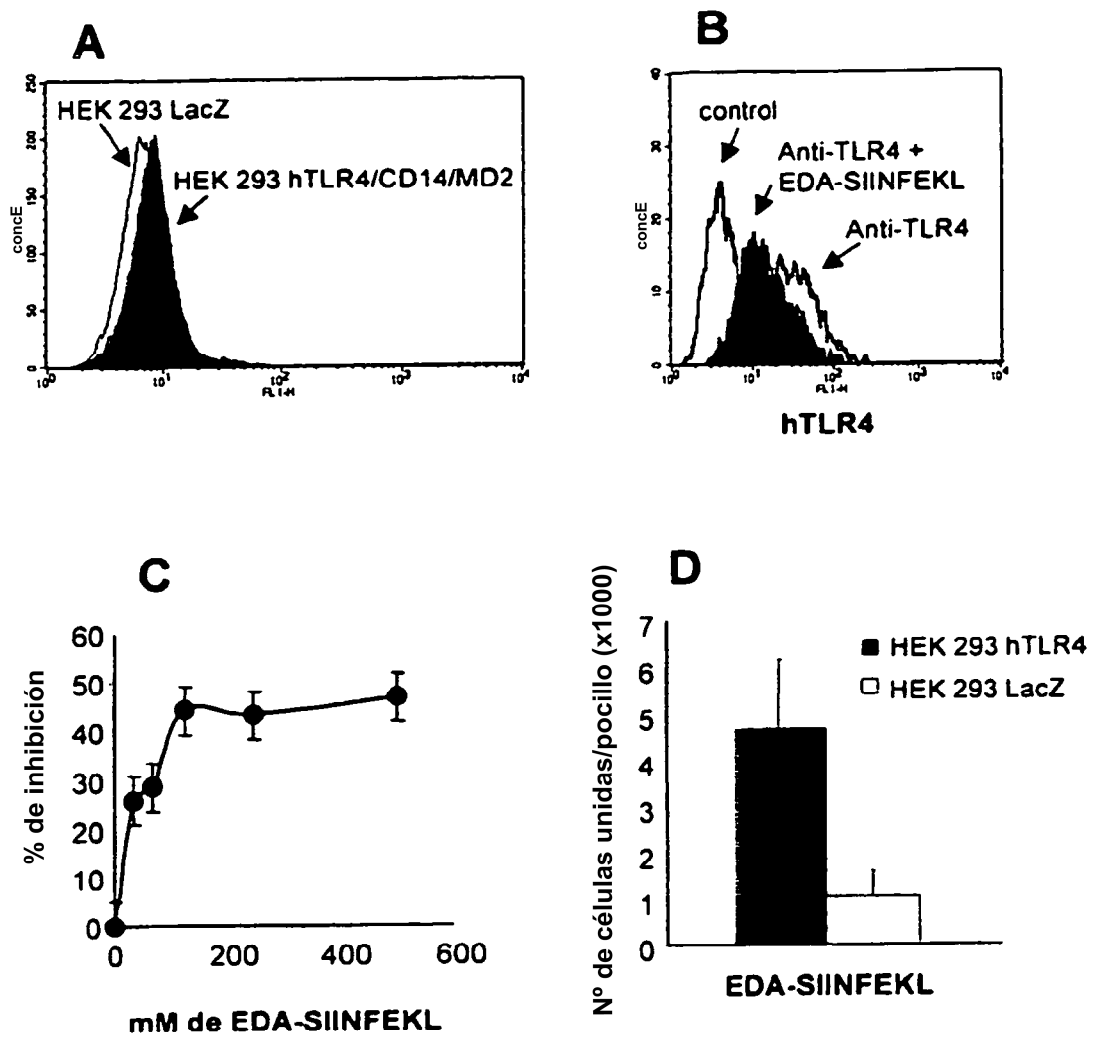


Figura 2

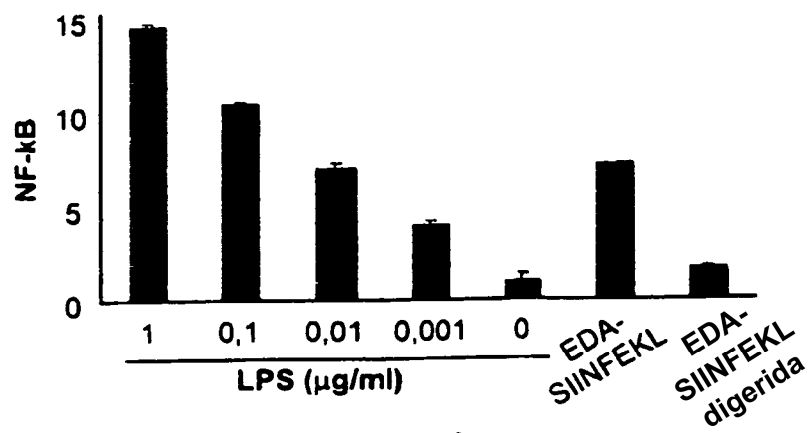


Figura 3

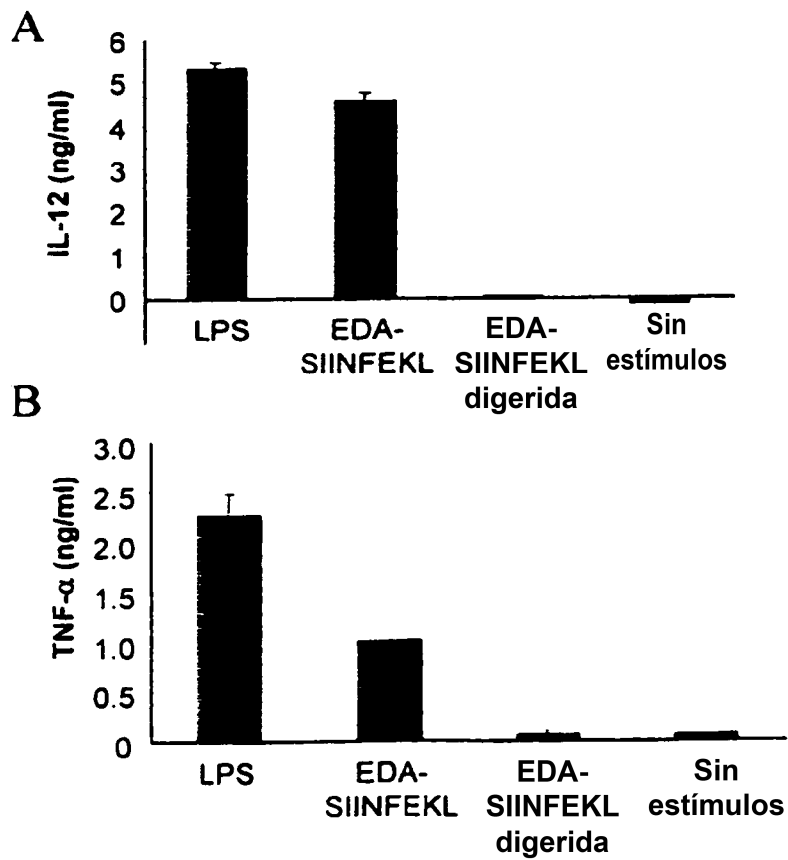


Figura 4

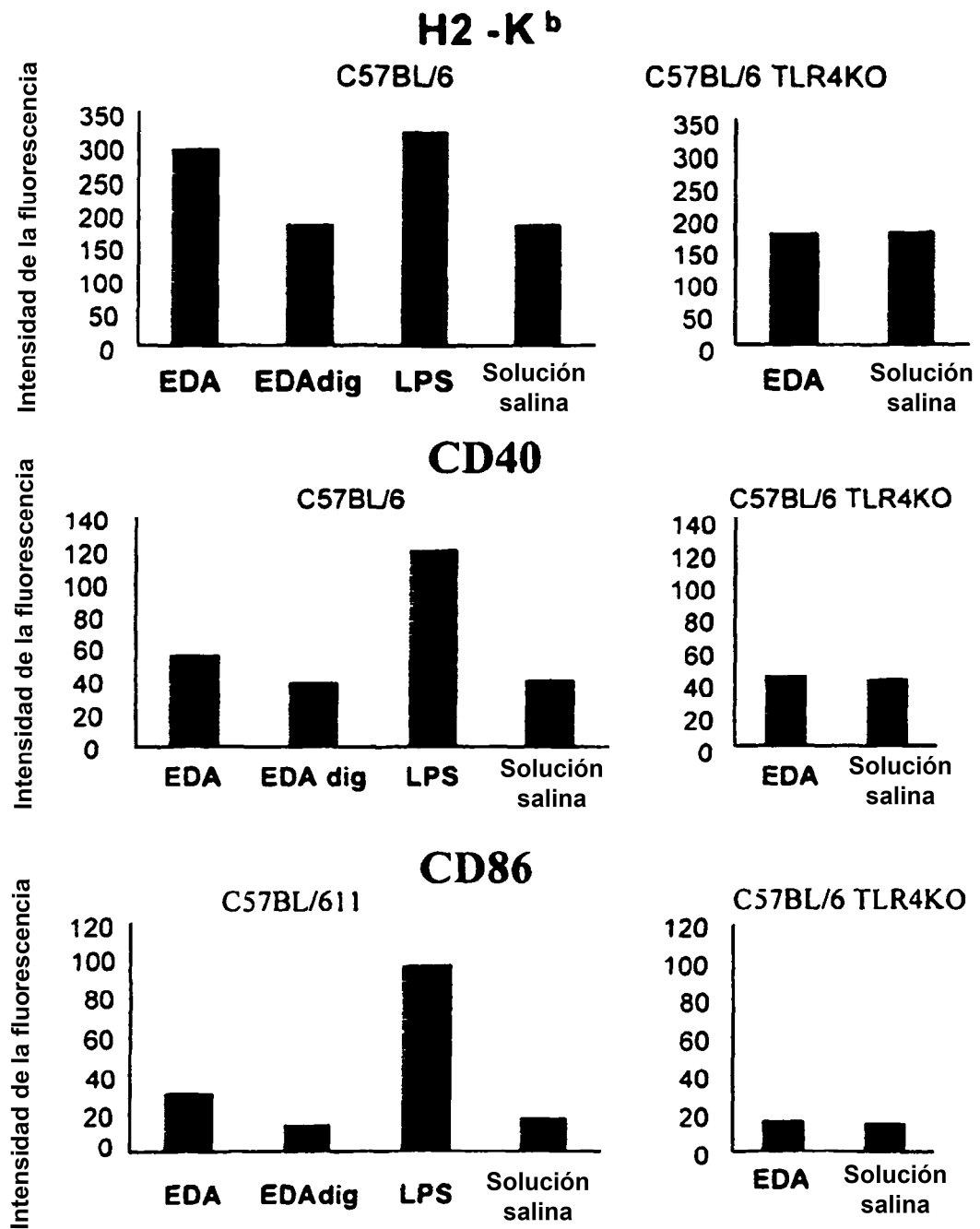


Figura 5A

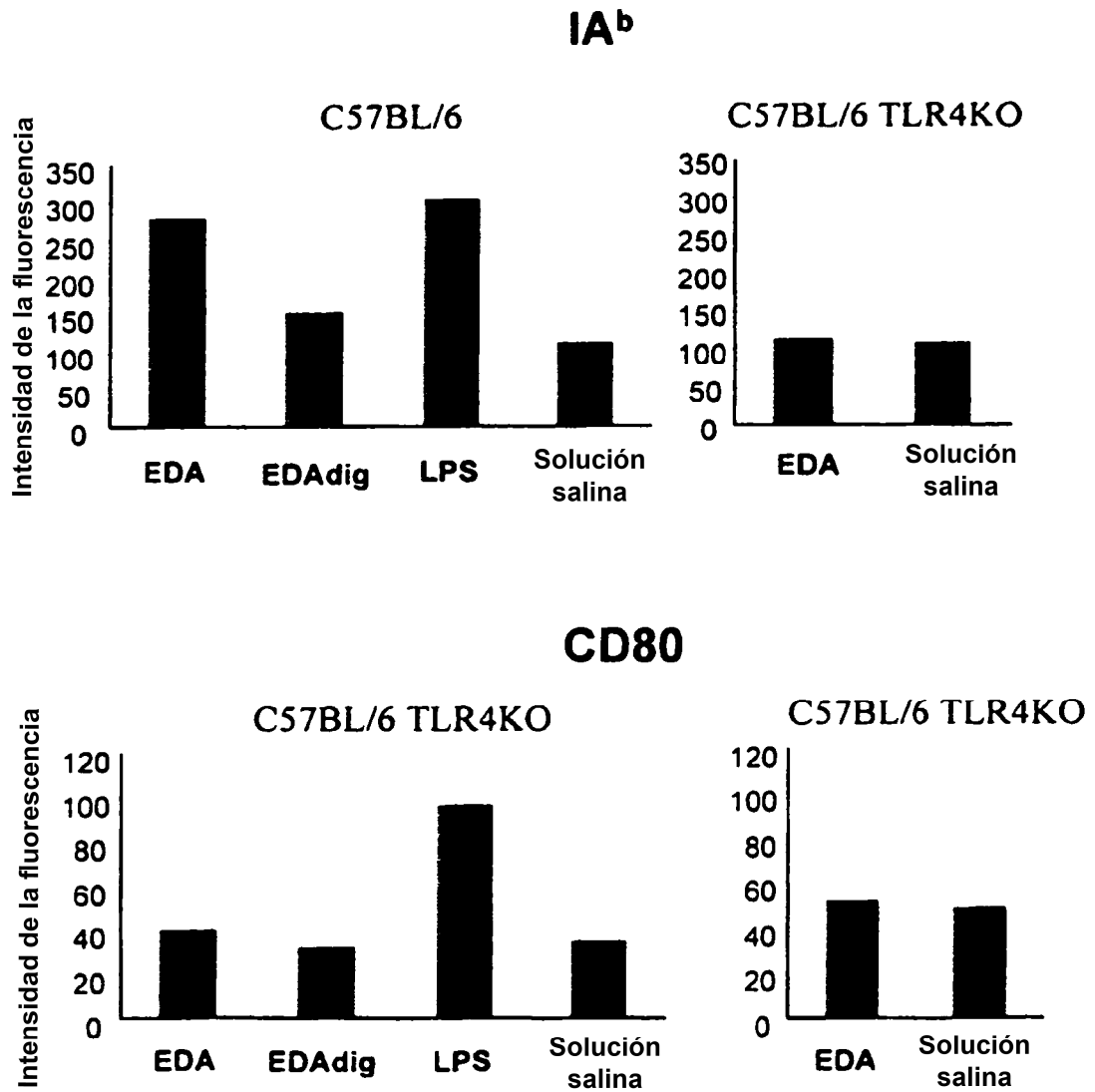


Figura 5B

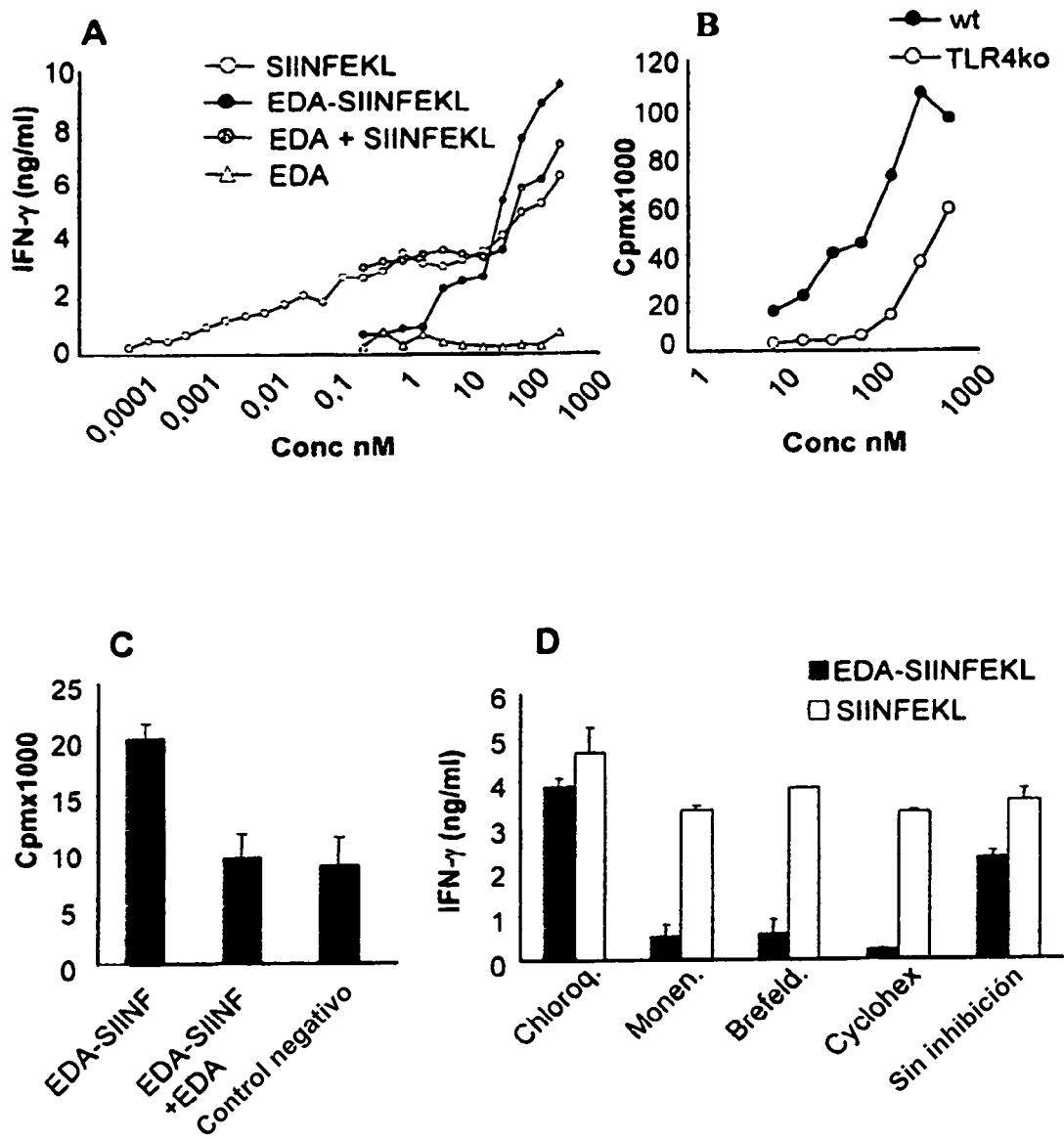


Figura 6

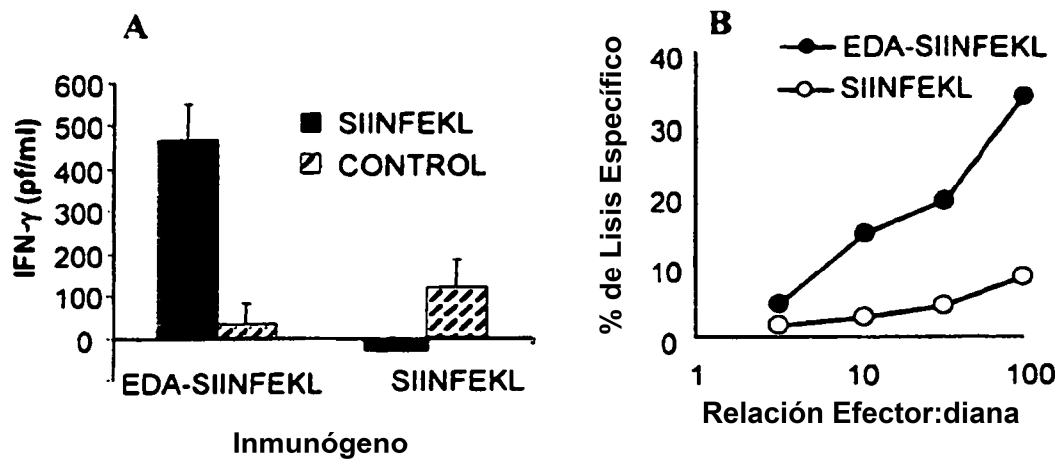


Figura 7

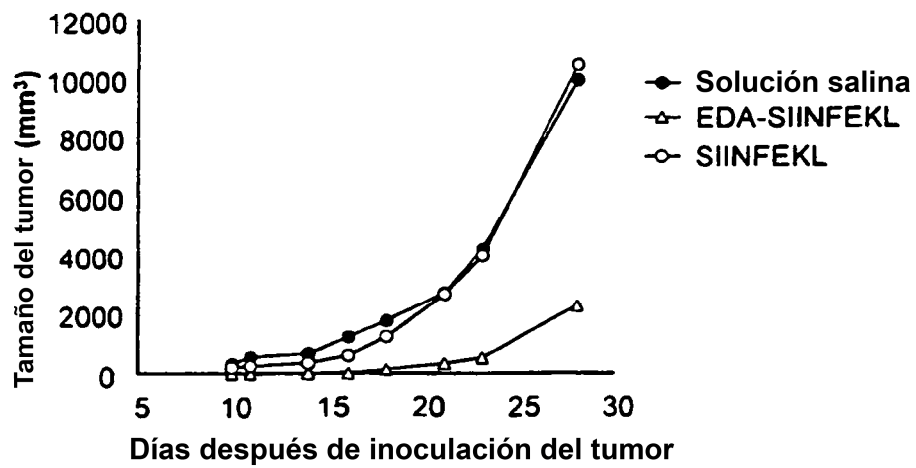


Figura 8

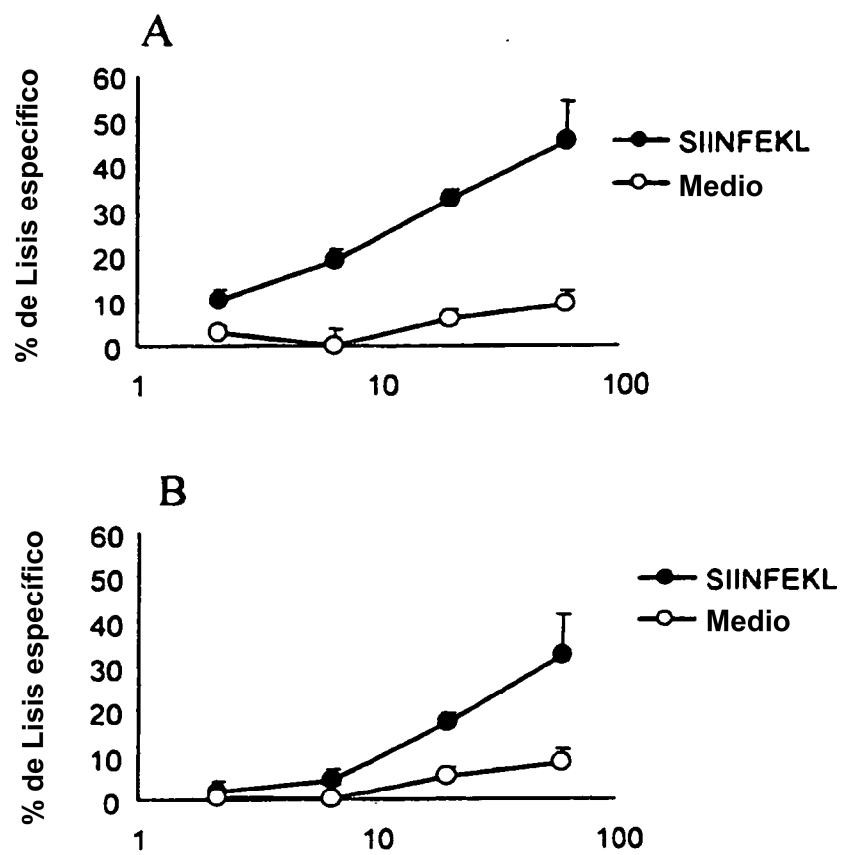


Figura 9

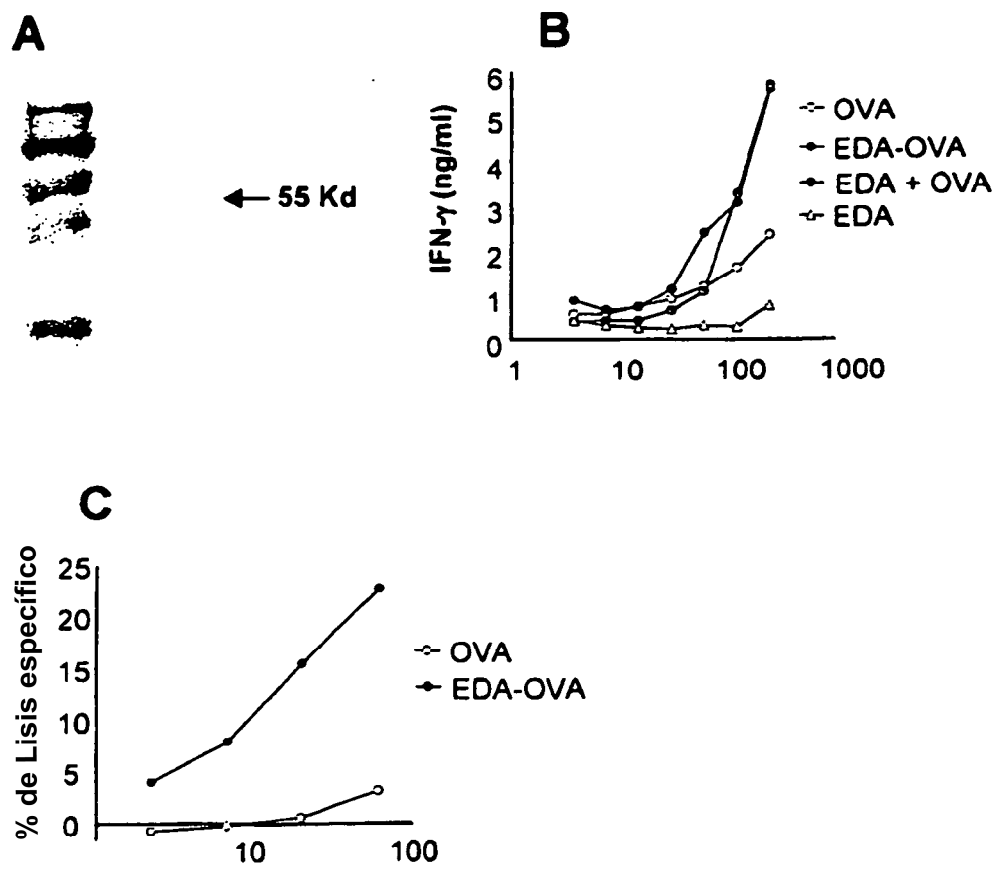


Figura 10

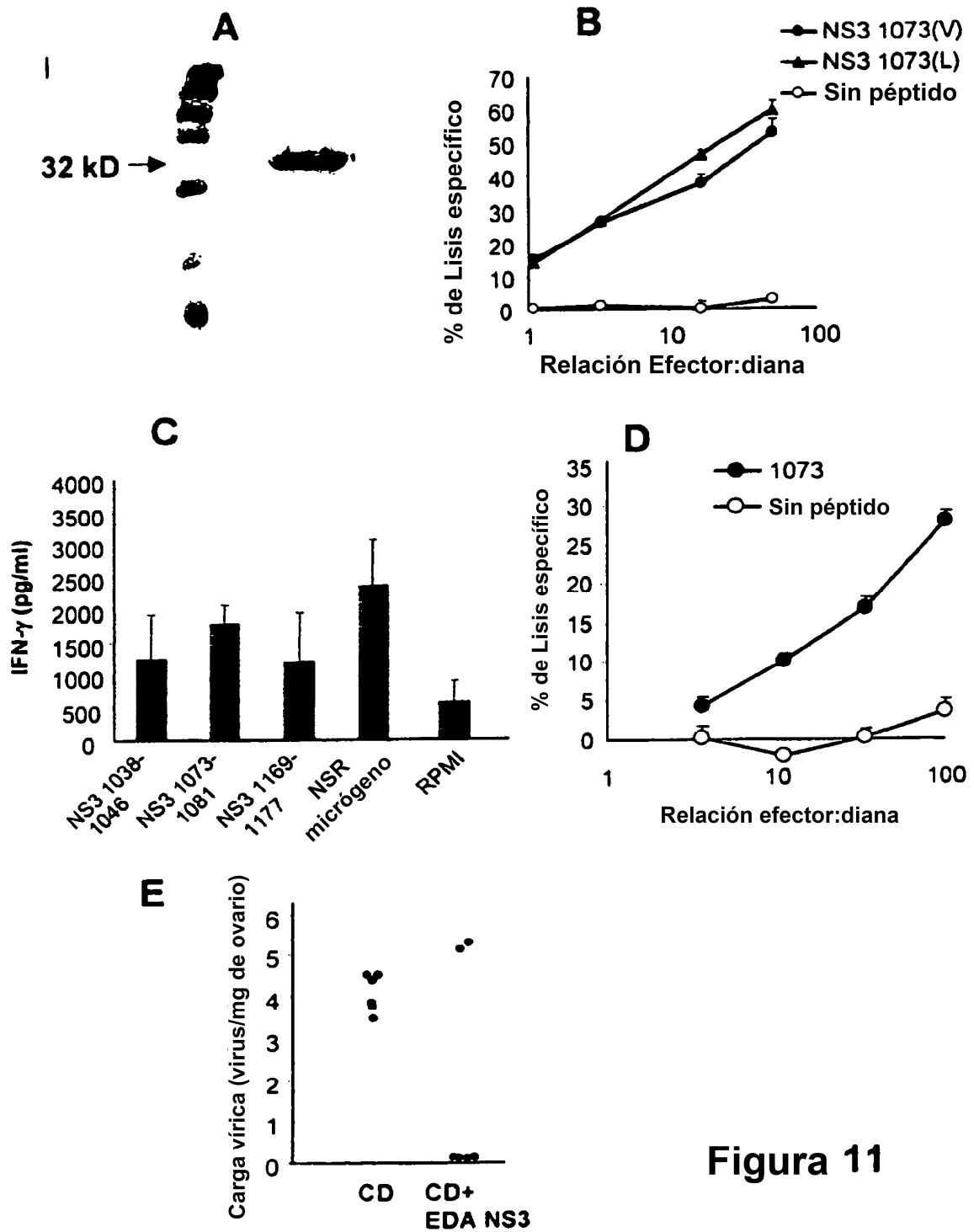


Figura 11