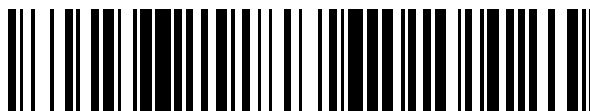


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 689**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2002** **E 02763958 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013** **EP 1385538**

54 Título: **Vacunas quiméricas que comprenden el dominio luminal de LAMP-1 o LAMP-2**

30 Prioridad:

05.04.2001 US 281607 P

05.04.2001 US 281608 P

05.04.2001 US 281621 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2013

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218 , US

72 Inventor/es:

AUGUST, THOMAS y
MARQUES, ERNESTO JR.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 404 689 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas quiméricas que comprenden el dominio luminal de LAMP-1 o LAMP-2

5 Aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad en virtud de 35 U.S.C. § 119 (e) para la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. Nº 60/281.607, Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 60/281.608 y Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 60/281.621, todas presentadas el 5 de abril de 2.001.

10 Concesiones del gobierno

El trabajo contenido en esta solicitud se realizó en virtud de la concesión del gobierno A1 41908 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

15 Campo de la invención

La invención se refiere a vacunas quiméricas que comprenden secuencias de antígenos y dominios de transporte, ácidos nucleicos que codifican los mismos y métodos para usar los mismos.

20 Antecedentes de la invención

El reconocimiento de antígenos y la respuesta en el sistema inmunitario de los mamíferos están gobernados, en parte, por la interacción entre células T y células presentadoras de antígenos. Vía su receptor de células T heterodímero, una célula T reconoce fragmentos peptídicos de antígenos presentados como un complejo con moléculas principales de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) (Yewdell and Bannen, *Cell* 62: 203, 1.990; Davis and Bjorkman, *Nature* 334: 395, 1.988). Hay dos sistemas celulares paralelos de células T y moléculas presentadoras de antígenos que distinguen entre dos tipos de antígenos, antígenos extraños introducidos desde fuera de la célula (tales como productos químicos extraños, bacterias y toxinas) y antígenos endógenos producidos dentro de la célula (tales como virus o productos oncogénicos) (Bevan, *Nature* 325: 192, 1.987; Braciale, et al., *Immunol. Rev.* 98: 95, 1.987; Germain, *Nature* 322: 687, 1.986).

Hay dos clases generales de moléculas del MHC, moléculas del MHC de clase I y MHC de clase II. Las moléculas del MHC de clase I presentan antígenos peptídicos procedentes en general de proteínas producidas de manera endógena para las células T_C CD8⁺, la célula T citotóxica predominante que es específica del antígeno. El sistema proteolítico relativo a la clase I de MHC está presente prácticamente en todas las células para el fin de degradar las proteínas muy anormales y las moléculas de vida corta o las proteínas víricas. Se cree que esta proteólisis no es lisosomal y que implica conjugación covalente dependiente de ATP a la ubiquitina polipeptídica (Goldberg, et al., *Nature* 357: 375, 1.992). Se postula que los fragmentos peptídicos, posiblemente junto con un complejo mayor de proteasomas, entran en el retículo endoplasmático o algún otro tipo de compartimento exocítico (distinto del compartimento endocítico/lisosomal). Allí se unen a moléculas de la clase I de MHC y siguen la ruta secretora constitutiva desde el retículo endoplasmático a través del Golgi a la superficie de la célula donde son presentados por la proteína del MHC I al receptor de antígenos de las células T citotóxicas CD3-CD8.

Las moléculas de la clase II del MHC presentan en general antígenos que son introducidos desde el exterior de las células en un procedimiento que implica la absorción celular de las moléculas que comprenden los antígenos y generación de fragmentos peptídicos antigénicos en organelos endosomales/lisosomales. Se cree en general que el procedimiento relativo a la clase II del MHC por el que los antígenos extraños son tratados en las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) tiene lugar en una ruta endocítica. Los antígenos llevados a la célula por pinocitosis en fase fluida, endocitosis absorptiva o fagocitosis entran en un compartimento endosomal/lisosomal donde se convierten las moléculas grandes en péptidos por digestión a través de las proteasas y otras hidrolasas. Durante este procedimiento, los péptidos más pequeños inmunodominantes entran en contacto con, y están unidos por, moléculas de la clase II del MHC y los péptidos son transportados a la superficie de la célula. En la superficie de la célula de la APC, estos péptidos cortos junto con moléculas de la clase II del MHC se unen al complejo CD3-CD4 en la superficie de las células T auxiliares, activando la replicación y la función inmunitaria de estas células. Después de esta interacción, las células T auxiliares liberan linfocinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los leucocitos e inhiben su emigración desde el sitio de infección. En general, se requiere la activación de las células T auxiliares por APC cargada de péptidos para la acción óptima de las células B y las células T y así es necesaria para la función apropiada del sistema inmunitario.

(Guagliardi, et al., *Nature* 343: 133, 190). Los antígenos tratados parcialmente y los antígenos fácilmente degradables pueden proporcionar péptidos que se pueden combinar con clase II del MHC en el compartimento endosomal temprano. Sin embargo, se soporta la prueba de que el sitio principal de tratamiento de antígeno y asociación con clase II del MHC tenga lugar en el endosoma tardío, el lisosoma o un compartimento distinto relativo al lisosoma (Neefjes, et al., *Cell* 61: 171, 1.990).

Las funciones de los dos tipos de células T son significativamente diferentes, como se implica por sus nombres. Las células T citotóxicas erradican los patógenos intracelulares y los tumores por lisis directa de las células y por secreción de citocinas tales como el interferón γ . Las células T auxiliares también pueden lisar células, pero su función principal es segregar citocinas que activen las actividades de las células B (células productoras de anticuerpos) y otras células T y así mejoran ampliamente la respuesta inmunitaria a los antígenos extraños, incluyendo mecanismos de respuesta mediados por anticuerpos y mediados por T_c .

Las células T $CD4^+$ son el principal fenotipo de células T auxiliares en la respuesta inmunitaria. Esta función predominante es generar citocinas que regulen esencialmente todas las demás funciones de la respuesta inmunitaria. Los animales con células $CD4^+$ reducidas o los seres humanos con células $CD4^+$ reducidas (como en pacientes con SIDA) fracasan en la generación de respuestas de anticuerpos, respuestas de células T citotóxicas o respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado. Se conoce en la técnica que las células T auxiliares son críticas en la regulación de respuestas inmunitarias.

También se ha demostrado que las células restringidas de clase II del MHC $CD4^+$ presentan capacidad citotóxica en una serie de sistemas. Uno de los casos relevantes de enfermedad más importantes en que se han demostrado células T citotóxicas $CD4^+$ es en la respuesta a fragmentos de la proteína gp120 del VIH (Polydefkis, et al., *J. Exp. Med.* 171: 875, 1.990). Las células restringidas de la clase II del MHC $CD4^+$ también han demostrado que son críticas en la generación de respuestas inmunitarias sistémicas frente a los tumores. En un modelo de transferencia adoptiva, las células $CD4^+$ son críticas en la eliminación de tumores FBL en ratones. En el modelo de inmunoterapia activa de Golumbek, et al. *Science* 254: 713, 1.991, las células $CD4^+$ también se ha demostrado que son críticas en la respuesta inmunitaria sistémica frente a una serie de tumores malignos sólidos diferentes.

Debido a que las células restringidas de la clase II del MHC $CD4^+$ parecen ser las células de la memoria críticas en el arma de las células T de la respuesta inmunitaria, una estrategia apropiada de vacunación es generar poblaciones de células T de memoria restringidas de clase II del MHC específicas para el antígeno $CD4^+$.

Las vacunas tradicionales cuentan con organismos completos, cepas patógenas que han sido matadas o cepas con patogenicidad atenuada. Por una parte, estas vacunas corren el riesgo de introducir la enfermedad para cuya prevención se diseñan si la atenuación es insuficiente o si sobreviven suficientes organismos a la etapa de muerte durante la preparación de la vacuna. Por otra parte, dichas vacunas presentan una infectividad reducida y con frecuencia son insuficientemente inmunógenas, dando como resultado una protección inadecuada de la vacunación.

Recientemente, se han usado técnicas biológicas moleculares en un intento para desarrollar nuevas vacunas basadas en proteínas antigénicas individuales a partir de los organismos patógenos. Conceptualmente, el uso de péptidos antigénicos más bien que organismos completos evitaría la patogenicidad al tiempo que se proporcionaría una vacuna con los epítopos más inmunógenos. Sin embargo, se ha encontrado que los péptidos puros o los carbohidratos tienden a ser inmunógenos débiles, pareciendo requerir un adyuvante químico para ser tratado apropiadamente o presentado eficazmente al sistema inmunitario. Una vacuna dependiente de las respuestas de las células T debería contener tantos epítopos de células T como fuera necesario para estimular la inmunidad en una población objetivo de diversos tipos de MHC. Además, puesto que el reconocimiento de las células T requiere el tratamiento de proteínas intracelulares, las preparaciones de vacunas que faciliten la internalización y el tratamiento del antígeno deberían generar una respuesta inmunitaria más eficaz. Los intentos previos para antígenos directos para moléculas del MHC (véase, la Patente de EE.UU. N° 4.400.276) no fueron eficaces debido a que se evitó la etapa de tratamiento del antígeno. Se ha preparado una vacuna contra la hepatitis B exitosa usando antígeno superficial clonado del virus de la hepatitis B, pero esto parece ser debido a la tendencia de la molécula de antígeno de la superficie de la hepatitis a agregarse, formando partículas regulares que son altamente inmunógenas.

Las vacunas genéticas (ADN) son nuevos y prometedores candidatos para el desarrollo de las vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. Han demostrado ser seguras y la ausencia de respuestas inmunitarias a una cadena principal del vector puede ser una ventaja definitiva si se requieren ciclos repetidos de vacunación para conseguir beneficios clínicos. Sin embargo, una potencial desventaja de las vacunas de ADN convencionales es su baja inmunogenicidad en seres humanos. Una causa probable de esta baja inmunogenicidad es el acceso restringido de los antígenos formados dentro de las células a la ruta de MHC II para el tratamiento de antígeno y la presentación a células T auxiliares.

La Patente de EE.UU. N° 5.633.234 describe proteínas quiméricas que comprenden un dominio antigénico y una señal objetivo endosomal/lisosomal citoplasmática que fija como objetivo con eficacia antígenos a ese compartimento. Se trató el dominio antigénico y los péptidos del mismo fueron presentados en la superficie de la célula junto con moléculas de clase II de histocompatibilidad principal (MHC). Se usó la cola citoplasmática de LAMP-1 para formar el dominio objetivo endosomal/lisosomal de la proteína quimérica.

Sumario de la invención

Es un objeto de esta invención proporcionar vacunas con inmunogenicidad mejorada, en particular, vacunas genéticas tales como vacunas de ADN o ARN.

Es un objeto más de esta invención proporcionar métodos más eficaces de vacunación, por el uso de inmunógenos (sin tener en cuenta si proceden de proteínas de membrana o no de membrana) que estén dirigidos al compartimento lisosomal/endosomal y organelos relacionados (por ej., tales como MHC, CIIV, melanosomas, gránulos secretores, gránulos de Birbeck y similares) donde se tratan y se presentan a moléculas de clase II de complejo de histocompatibilidad principal (MHC) a fin de que se estimulen con preferencia las células T auxiliares.

Es otro objeto más de esta invención proporcionar métodos mejorados de tratamiento para el cáncer por la provocación de una respuesta inmunitaria anti-tumor por estimulación de las células T auxiliares.

En un aspecto, la invención proporciona una proteína quimérica, que comprende: un dominio N-terminal que comprende al menos un epítipo de un antígeno y un dominio de transporte; en la que el dominio de transporte dirige las proteínas tanto de membrana como no de membrana a un compartimento endosomal (por ej., un lisosoma) en una célula. Preferiblemente, el dominio de transporte comprende el dominio luminal de un polipéptido de LAMP, tal como un polipéptido de LAMP-1 o LAMP-2.

En otro aspecto, la proteína quimérica comprende una secuencia objetivo que dirige la proteína a un compartimento endosomal/lisosomal o un organelo relacionado para tratamiento de proteínas y unión péptido epítipo a MHC II, tal como la secuencia de tetrapéptidos Tyr- Xaa-Xaa-Xbb, en la que Xaa es cualquier aminoácido y Xbb es un aminoácido hidrófobo. En otro aspecto más, la secuencia objetivo comprende una secuencia dileucina. En un aspecto más, la secuencia objetivo comprende un dominio que fija como objetivo proteínas citosólicas a partir de un receptor endocítico. Los dominios adecuados, incluyen, pero no se limitan al dominio objetivo de un receptor de lectina de tipo C, un polipéptido DEC-205, proteína gp200-MR6 u homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos. MR6. En un aspecto preferido, la proteína quimérica comprende además un polipéptido Gag. En un aspecto, el polipéptido Gag es insertado en una porción del dominio luminal de un polipéptido de LAMP. Más preferiblemente, la proteína comprende además un dominio transmembrana y/o un dominio de señalización.

En un aspecto preferido en particular, la proteína comprende el dominio luminal de un polipéptido de LAMP y un dominio citoplasmático que comprende la secuencia de tetrapéptidos Tyr-Xaa-Xaa-Xbb, en la que Xaa es cualquier aminoácido y Xbb es un aminoácido hidrófobo. La proteína quimérica, preferiblemente, comprende además una proteína transmembrana. Aún más preferiblemente, la proteína quimérica también comprende un dominio de señalización.

Se puede usar cualquier tipo de antígeno para generar proteínas quiméricas. En un aspecto, el antígeno es seleccionado del grupo que consiste en: una porción de un material antigénico de un organismo patógeno, una porción de un material antigénico de un polipéptido específico de cáncer y una porción de un material antigénico de una molécula asociada a una respuesta fisiológica anormal (por ej., tal como una enfermedad autoinmunitaria, una reacción alérgica, cáncer o una enfermedad congénita) o una respuesta a un procedimiento de trasplante o injerto. En otro aspecto, el material antigénico es de un organismo patógeno que es un virus, microorganismo o parásito. En un aspecto más, el virus es un virus del VIH. Más de un antígeno puede estar incluido en cualquier proteína quimérica.

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas quiméricas descritas anteriormente. La invención también proporciona un vector que comprende el ácido nucleico en el que la molécula de ácido nucleico está unida de manera operable a una secuencia de control de la expresión. En un aspecto preferido, el vector es un vector de vacuna, adecuado para vacunar a un paciente contra el antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona un vehículo de suministro que comprende la molécula de ácido nucleico para facilitar la introducción de la molécula de ácido nucleico en una célula. El vehículo de suministro puede ser a base de lípidos (por ej., una formulación de liposomas), a base de virus (por ej., comprendiendo proteínas víricas encapsulando la molécula de ácido nucleico) o a base de células. En un aspecto preferido, el vector es un vector de vacuna.

La invención también proporciona una célula que comprende cualquiera de los vectores descritos anteriormente. En un aspecto, la célula es una célula presentadora de antígeno. La célula presentadora de antígeno puede ser una célula presentadora de antígeno profesional (por ej., una célula dendrítica, macrófago, célula B y similar) o una célula presentadora de antígeno de ingeniería (por ej., una célula presentadora de antígeno no profesional lograda por ingeniería para expresar las moléculas requeridas para presentación de antígeno, tales como moléculas de clase II del MHC). Las moléculas requeridas para presentación de antígeno pueden proceder de otras células, por ej., que se encuentren en la naturaleza o se puedan lograr ellas mismas (por ej., mutadas o modificadas para expresar las propiedades deseadas, tales como mayor o menor afinidad para un epítipo antigénico). En un aspecto, la célula presentadora de antígeno no expresa señales co-estimuladoras y el antígeno es un auto-antígeno.

La invención proporciona adicionalmente un estuche que comprende una pluralidad de células que comprenden cualquiera de los vectores descritos anteriormente. Al menos dos de las células expresan diferentes moléculas de clase II del MHC y cada célula comprende el mismo vector. En un aspecto, se proporciona un estuche que comprende un vector y una célula para recibir al vector.

La invención también proporciona un animal transgénico que comprende al menos una de las células descritas anteriormente.

La invención también proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria en un animal a un antígeno, que comprende: administrar al animal una célula como se describió anteriormente, en el que se expresa la célula o se puede inducir para expresar, la proteína quimérica en el animal. En un aspecto, la célula comprende una molécula de clase II del MHC compatible con proteínas del MHC del animal, de manera que el animal no genere una respuesta inmunitaria contra la molécula de clase II del MHC. En un aspecto preferido, el animal es un ser humano.

En un aspecto, la invención proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria a un antígeno, que comprende administrar a un animal, cualquiera de los vectores descritos anteriormente. Preferiblemente, el vector es infeccioso para una célula del animal. Por ejemplo, el vector puede ser un vector vírico, tal como un vector de vaccinia. El antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en: una porción de un material antigénico de un organismo patológico, una porción de un material antigénico de un polipéptido específico de cáncer y una porción de un material antigénico de una molécula asociada a una respuesta fisiológica anormal o un antígeno de trasplante. En un aspecto, el organismo patológico es un virus, microorganismo o parásito. En otro aspecto, el virus es un virus del VIH. En otro aspecto más, la respuesta fisiológica anormal es una enfermedad autoinmunitaria, una reacción alérgica, cáncer o una enfermedad congénita.

En un aspecto más, se obtiene una célula de un paciente, el vector se introduce en la célula o la célula o progenie de la célula se reintroduce en el paciente. En un aspecto, la célula es un hemocitoblasto capaz de diferenciación en una célula presentadora de antígeno. En otro aspecto, la célula no expresa ninguna señal coestimuladora y el antígeno es un autoantígeno.

Breve Descripción de las Figuras

Los objetos y las características de la invención se pueden entender mejor con referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

La Figura 1A es una representación esquemática de las diferentes construcciones de plásmidos. La Figura 1B es un análisis de métodos Western de células COS transfectadas con diferentes plásmidos sondados con anti-Gag). Las flechas horizontales indican la región promotora de los plásmidos y las áreas en cajas representan las estructuras de lectura abiertas. Las cajas separadas representan los diferentes trozos de las quimeras de proteína indicadas en la clave más adelante. Las cajas de TM/CYD indican los dominios de transmembrana y citoplasmáticos incluidos en la construcción. Los diamantes rojos indican los AAV-ITR añadidos al vector de expresión.

La Figura 2 muestra una respuesta de los anticuerpos de lisado anti-VIH en un promedio de ratones individuales (n=5). El análisis ELISA de unión de anticuerpo a proteína de un lisado de tritón X-100 vírico del VIH-1, 50 ul de 5 ug/ml añadidas a la placa.

La Figura 3 muestra el título de una respuesta de los anticuerpos de lisado anti-VIH en inmunizaciones individuales.

Las Figuras 4A y B muestran una respuesta de los anticuerpos de lisado anti-VIH el día 29 después de la primera inmunización y 15 días después de la segunda inmunización; promedio de ratones individuales (n=6).

La Figura 5 muestra un Interferón gamma y ensayo de IL4 el día 45 después de inmunización con 50 µg de ADN los días 0 y 30. Se estimularon células de bazo por medio (control), 5 µg de proteína Gag. IZQUIERDA: producción de IL4 específica de proteína p55 Gag. DERECHA: producción de INFγ específico de p55 Gag.

La Figura 6 muestra un ensayo de IL-4 PCR en tiempo real el día 45 después de inmunización con 50 µg de ADN los días 0 y 30. Se estimularon células de bazo por medio (control) y 5 µg de proteína Gag.

Las Figuras 7A-D muestran los efectos de quimeras LAMP/Gag sobre las respuestas de citocinas mediadas por CD4 específicas del antígeno. La Figura 7E muestra diversos vectores que codifican las quimeras.

La Figura 8 muestra vectores usados para vigilar el transporte de quimeras LAMP/Gag/DEC según un aspecto de la invención.

La Figura 9 muestra el análisis de métodos Western de células COS transfectadas con quimeras

LAMP/Gag/DCLR.

Las Figuras 10A-F muestran inmunofluorescencia de células transinfectadas con quimeras LAMP/Gag/DCLR.

- 5 Las Figuras 11A-B, C1-C3 muestran comparaciones de la respuestas inmunitarias inducidas por el transporte de LAMP/Gag/DCLR.

Descripción detallada

- 10 La invención proporciona proteínas quiméricas y ácidos nucleicos que codifican éstas que se pueden usar para generar vacunas contra antígenos seleccionados. En un aspecto, una proteína quimérica comprende una secuencia de antígenos y un dominio para transporte de la proteína a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado, con independencia de si el antígeno procede de una proteína de membrana o no de membrana. En un aspecto preferido, el dominio de transporte comprende un dominio luminal de un polipéptido de LAMP.
- 15 Alternativamente, o adicionalmente, la proteína quimérica comprende un dominio de transporte de un receptor endocítico (por ej., tal como lectina de tipo C, DEC-205 o gp200-MR6). Las vacunas se pueden usar para modular o aumentar una respuesta inmunitaria. En un aspecto preferido, la invención proporciona un método para tratar a un paciente con cáncer proporcionando una proteína quimérica que comprende un antígeno específico de cáncer o un ácido nucleico que codifica la proteína al paciente.

Definiciones

- 20 Las siguientes definiciones se proporcionan para términos específicos que se usan en la siguiente descripción escrita.

- 25 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. El término "una molécula de ácido nucleico" incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

- 30 Como se usa en la presente memoria, el término "que comprende" se desea que signifique que las composiciones y los métodos incluyen los elementos referidos, pero no excluyen otros elementos. "Que consiste esencialmente en, cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier trascendencia esencial a la combinación. Así, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definió en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como disolución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significará que excluye más de elementos traza de otros ingredientes y etapas del método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

- 40 Como se usa en la presente memoria, "el compartimento lisosomal/endosomal" se refiere a vacuolas ácidas unidas a la membrana que contienen moléculas de LAMP en la membrana, enzimas hidrolíticas que actúan en el tratamiento de los antígenos y moléculas de la clase II del MHC para el reconocimiento y la presentación de antígenos. Este compartimento actúa como un sitio para la degradación de materiales extraños internalizados desde la superficie de la célula por cualquiera de una variedad de mecanismos incluyendo endocitosis, fagocitosis y pinocitosis y de material intracelular suministrado a este compartimento por fenómenos autolíticos especializados (de Duve, *Eur. J. Biochem.* 137: 391, 1.983). El término "endosoma" como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones incluye un lisosoma.

- 50 Como se usa en la presente memoria, un "organelo relacionado con lisosoma" se refiere a cualquier organelo que comprenda lisosomas e incluye, pero no se limita a, MIIC, CIIV, melanosomas, gránulos secretores, gránulos líticos, gránulos densos en plaquetas, gránulos basófilos, gránulos de Birbeck, fagolisosomas, lisosomas secretores y similares. Preferiblemente, dicho organelo carece de receptores de manosa 6-fosfato y comprende LAMP, pero puede o no comprender una molécula de clase II del MHC. Para revisiones, véase, por ej., Blott and Griffiths, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2.002; Dell'Angelica, et al., *The FASEB Journal* 14: 1.265-1.278, 2.000.

- 60 Como se usa en la presente memoria, los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden presentar cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas mono, bicatenarias y de triple hélice, un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, moléculas antisentido, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, aptámeros, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender
- 65 moléculas de ácido nucleico modificadas (por ej., comprendiendo bases modificadas, azúcares y/o ligadores

internucleótidos).

Como se usa en la presente memoria, el término "péptido" se refiere a un compuesto de dos o más aminoácidos subunidad, análogos de aminoácido o peptidomiméticos. Las subunidades se pueden ligar mediante enlaces peptídicos o por otros enlaces (por ej., como ésteres, éteres y similares).

Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y ambos isómeros ópticos D o L y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga (por ej., mayor que aproximadamente 10 aminoácidos), el péptido se denomina comúnmente un polipéptido o una proteína. Aunque el término "proteína" incluye el término "polipéptido", un "polipéptido" puede ser una proteína de longitud menos que completa.

Como se usa en la presente memoria un "polipéptido de LAMP" se refiere a LAMP-1, LAMP-2, CD63/LAMP-3, DC-LAMP o cualquier proteína de membrana asociada lisosomal, u homólogos, ortólogos, variantes (por ej., variantes de alelos) y formas modificadas (por ej., comprendiendo una o más mutaciones, que se encuentren en la naturaleza o logradas por ingeniería). En un aspecto, un polipéptido de LAMP es una proteína de membrana asociada lisosomal de mamífero, por ej., tal como una proteína de membrana asociada lisosomal de ser humano o de ratón. Más en general, una "proteína de membrana lisosomal" se refiere a cualquier proteína que comprende un dominio encontrado en la membrana de un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosoma y que comprende además un dominio luminal.

Como se usa en la presente memoria, "un receptor endocítico" se refiere a una proteína transmembrana con su C-terminal o N-terminal frente al citoplasma y que comprende un dominio de transporte (por ej., un dominio luminal) para transportar un polipéptido o péptido conjugado a él (por ej., mediante un enlace químico) a una molécula de clase II del MHC o a un compartimento intracelular para asociación posterior con una molécula de clase II del MHC. Ejemplos de receptores endocíticos incluyen, pero no se limitan a, receptores Fc, receptores complemento, receptores de eliminadores, integrinas, lectinas (por ej., lectinas de tipo C), polipéptidos DEC-205, polipéptidos gp200-MR6, receptores de tipo Toll, receptores de proteínas de choque térmico (por ej., CD 91), receptores de cuerpos apoptóticos o cuerpos necróticos (por ej., tal como CD 14) u homólogos, ortólogos, variantes (por ej., variantes alélicas) y formas modificadas de los mismos (por ej., comprendiendo una o más mutaciones, que se encuentran en la naturaleza o logradas por ingeniería).

Como se usa en la presente memoria, "expresión" se refiere al procedimiento por el que se transcriben polinucleótidos en ARNm y/o se traducen en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido procede de ADN genómico, la expresión puede incluir el proceso de corte y empalme del ARNm transcrito del ADN genómico.

Como se usa en la presente memoria, "bajo control transcripcional" o "ligado de manera operable" se refiere a la expresión (por ej., transcripción o traducción) de una secuencia de polinucleótidos que se controla por una yuxtaposición apropiada de un elemento de control de la expresión y una secuencia codificadora. En un aspecto, una secuencia de ADN está "ligada de manera operativa" a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción de esa secuencia de ADN.

Como se usa en la presente memoria, "secuencia codificadora" es una secuencia que se transcribe y traduce en un polipéptido cuando se pone bajo el control de secuencias apropiadas de control de la expresión. Los límites de una secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio en el (amino) terminal 5' y un codón de detención de la traducción en el (carboxilo) terminal 3'. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a, una secuencia procariota, ADNc de ARNm eucariota, una secuencia de ADN genómico de ADN eucariota (por ej., mamífero) e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción estará situada normalmente en 3' para la secuencia codificadora.

Como se usa en la presente memoria, dos secuencias codificadoras "se corresponden" entre sí si las secuencias o sus secuencias complementarias codifican las mismas secuencias de aminoácidos.

Como se usa en la presente memoria, "secuencia señal" indica la secuencia de traslocaciones del retículo endoplasmático. Esta secuencia codifica un péptido señal que comunica a una célula para dirigir un polipéptido al que está unido (por ej., mediante un enlace químico) a un compartimento vesicular del retículo endoplasmático, para entrar en un organelo exocítico/endocítico, para ser suministrado a un compartimento vesicular celular, la superficie de la célula o para segregar el polipéptido. Esta secuencia señal a veces se corta por la célula en la maduración de una proteína. Se pueden encontrar secuencias señal asociadas a una variedad de proteínas naturales para procariotas y eucariotas.

Como se usa en la presente memoria, "transporte" indica movimiento o progreso del antígeno quimérico de polipéptidos por todos los organelos celulares o compartimentos en la ruta desde el retículo endoplasmático rugoso al compartimento endosomal/lisosomal u organelos relacionados donde tiene lugar el tratamiento del antígeno y la

unión a MHC II. "Transporte" se refiere a suministro de una proteína quimérica a un tipo particular de compartimento celular.

5 Como se usa en la presente memoria, "objetivo" indica la secuencia de polipéptidos que dirige el transporte del antígeno quimérico de polipéptidos al sitio preferido u organelos celulares o compartimento donde tiene lugar el tratamiento del antígeno y la unión a MHC II.

10 Como se usa en la presente memoria, "un dominio de transporte" se refiere a una serie de aminoácidos continuos o discontinuos en una proteína que son requeridos para flujo vesicular de la proteína por uno o más compartimentos celulares/organelos. Un dominio de transporte comprende preferiblemente necesariamente secuencias para el plegamiento apropiado de la proteína para mediar este flujo. En un aspecto, un dominio de transporte comprende una secuencia luminal; preferiblemente, dicha secuencia comprende uno o más sitios de unión para interacciones con una proteína de plegamiento celular tal como una chaperona.

15 Por el contrario, como se usa en la presente memoria, un "dominio objetivo" se refiere a una serie de aminoácidos que se requieren para suministro a un compartimento celular/organelo. Preferiblemente, un dominio objetivo es una secuencia que se une a un adaptador o proteína AP (por ej., tal como una proteína AP1, AP2 o AP3). Se describen secuencias de dominios objetivo ejemplares en Dell'Angelica, 2.000, *supra*.

20 Un "ADN quimérico" es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula de ADN mayor que no se encuentra junto con la molécula más grande en la naturaleza. Así, cuando el ADN quimérico codifica un segmento de la proteína, la secuencia que codifica el segmento estará flanqueada por ADN que no flanquea la secuencia codificadora en ningún genoma que se encuentre en la naturaleza. Las variaciones alélicas o casos mutacionales que se encuentran en la naturaleza no dan lugar a un ADN quimérico como se definió en la presente memoria.

25 Como se usa en la presente memoria, un "vector de suministro de ácidos nucleicos" es una molécula de ácido nucleico que puede transportar un polinucleótido de interés en una célula. Preferiblemente, dicho vector comprende una secuencia codificadora ligada de manera operable a una secuencia de control de la expresión. Sin embargo, una secuencia de polinucleótidos de interés puede no comprender necesariamente una secuencia codificadora. Por ejemplo, en un aspecto una secuencia de polinucleótidos de interés es un aptámero que se une a una molécula objetivo. En otro aspecto, la secuencia de interés es una secuencia complementaria de una secuencia reguladora que se une a una secuencia reguladora para inhibir la regulación de la secuencia reguladora. En otro aspecto más, la secuencia de interés es una secuencia reguladora (por ej., para valorar factores reguladores en una célula).

35 Como se usa en la presente memoria, un "un vehículo de suministro de ácidos nucleicos" se define como cualquier molécula o grupo de moléculas o macromoléculas que puede llevar polinucleótidos insertados a una célula huésped (por ej., tal como genes o fragmentos de genes, moléculas antisentido, ribozimas, aptámeros y similares) y que tiene lugar junto con un vector de ácidos nucleicos como se describió anteriormente.

40 Como se usa en la presente memoria, "suministro de ácidos nucleicos" o "transferencia de ácidos nucleicos," se refiere a la introducción de un polinucleótido exógeno (por ej., tal como un "transgen") en una célula huésped, con independencia del método usado para la introducción. El polinucleótido introducido se puede mantener de manera estable o de manera transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable requiere típicamente que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o se integre en un replicón de la célula huésped tal como un replicón extracromosomal (por ej., un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial.

50 Como se usa en la presente memoria, un "vector vírico" se refiere a un virus o partícula vírica que comprende un polinucleótido que se tiene que suministrar a una célula huésped, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirus, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovíricos y similares. En aspectos en que la transferencia génica está mediada por un vector adenovírico, una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma de adenovirus o parte del mismo y un gen no adenovírico, seleccionado, junto con proteínas de la cápside adenovírica.

55 Como se usa en la presente memoria, "transferencia de genes mediada por adenovirus" o "transducción adenovírica" se refiere al procedimiento por el que un gen o secuencias de ácidos nucleicos se transfieren a una célula huésped en virtud del adenovirus que entra en la célula. Preferiblemente, el virus es capaz de replicarse y/o integrarse y ser transcrito dentro de la célula.

60 Como se usa en la presente memoria, "partículas de adenovirus" son viriones de adenovirus individuales formados de una cápside externa y material de ácidos nucleicos interno, donde la cápside está formada además de proteínas de envoltura de adenovirus. Las proteínas de envoltura de adenovirus se pueden modificar para comprender un polipéptido de fusión que contiene un ligando de polipéptido unido mediante enlaces covalentes a la proteína vírica, por ej., para fijar como objetivo la partícula adenovírica a una célula particular y/o tipo de tejido.

65

Como se usa en la presente memoria, el término "administrar una molécula a una célula" (por ej., un vector de expresión, ácido nucleico, un factor accesorio, un vehículo de suministro, agente y similares) se refiere a transducción, transinfección, microinyección, electroporación o punzonado de la célula con la molécula. En algunos aspectos, las moléculas son introducidas en una célula objetivo poniendo en contacto la célula objetivo con una célula de suministro (por ej., por fusión de células o por lisado de la célula de suministro cuando está cerca de la célula objetivo).

Como se usa en la presente memoria, "hibridación" se refiere a una reacción en que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se establezca por enlace de hidrógeno entre las bases de los restos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno puede tener lugar por apareamiento de bases de Watson-Crick, unión de Hoogsteen o en cualquier otra manera específica de la secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo multicatenario, una sola cadena de autohibridación o cualquier combinación de éstas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un procedimiento más extenso, tal como la iniciación de una reacción PCR o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Como se usa en la presente memoria, un polinucleótido o región polinucleótida (o un polipéptido o región polipeptídica) que presenta un cierto porcentaje (por ejemplo, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 99%) de "identidad de la secuencia" a otra secuencia significa que, cuando se alinean lo máximo, usando programas informáticos rutinarios en la técnica, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo en comparación con las dos secuencias.

Dos secuencias son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75% y preferiblemente al menos aproximadamente 80% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90 ó 95% de los nucleótidos iguala la longitud definida de las secuencias de ADN. De manera similar, dos secuencias de polipéptidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 66%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75% y preferiblemente al menos aproximadamente 80% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90 ó 95% de los restos de aminoácidos del polipéptido se iguala por una longitud definida de la secuencia del polipéptido. Se pueden identificar las secuencias que son sustancialmente homólogas comparando las secuencias usando el programa informático estándar disponible en los bancos de datos de secuencias. También se pueden identificar secuencias sustancialmente homólogas de ácidos nucleicos en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas como se define para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del alcance de la técnica.

Como se usa en la presente memoria, una "secuencia de transporte" que es sustancialmente homóloga a otra secuencia de transporte es una que comparte homología sustancial con la otra secuencia de transporte; sin embargo, el último ensayo para homología sustancial es un ensayo funcional en que un polipéptido que comprende sustancialmente una secuencia sustancialmente homóloga a una secuencia de transporte es capaz de co-localizarse al mismo compartimento endosomal como la secuencia de transporte.

También se pueden proporcionar "variantes modificadas de manera conservadora" de secuencias del dominio. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, variantes modificadas de manera conservadora se refiere a esos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o en el caso de que el ácido nucleico no codifique una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner, et al., 1.991, *Nucleic Acid Res.* 19: 5.081; Ohtsuka, et al., 1.985, *J. Biol. Chem.* 260: 2.605-2.608; Rossolini et al., 1.994, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98).

El término "fragmento biológicamente activo", "forma biológicamente activa", "equivalente biológicamente activo" de y "derivado funcional" de una proteína natural, posee una actividad biológica que es al menos sustancialmente igual (por ej., no significativamente diferente de) la actividad biológica de la proteína natural cuando se mide usando un ensayo adecuado para detectar la actividad. Por ejemplo, un fragmento biológicamente activo que comprende un dominio de transporte es uno que puede colocarse al mismo compartimento como un polipéptido de longitud completa que comprende el dominio del transporte.

Como se usa en la presente memoria, suministro de ácido nucleico "in vivo", transferencia de ácido nucleico, tratamiento de ácidos nucleicos y similares, se refiere a la introducción de un vector que comprende un polinucleótido exógeno directamente en el cuerpo de un organismo, tal como un ser humano o mamífero no humano, según lo cual el polinucleótido exógeno es introducido en una célula de dicho organismo *in vivo*.

Como se usa en la presente memoria, el término "*in situ*" se refiere a un tipo de suministro *in vivo* de ácidos nucleicos en que el ácido nucleico es llevado cerca de una célula objetivo (por ej., el ácido nucleico no se administra de manera sistémica). Por ejemplo, los métodos de suministro *in situ* incluyen, pero no se limitan a, inyectar un ácido nucleico directamente a un sitio (por ej., a un tejido, tal como un tumor o músculo cardíaco), poner en contacto el ácido nucleico con célula(s) o tejido a través de un campo quirúrgico abierto o suministrar el ácido nucleico a un sitio usando un dispositivo de acceso médico tal como un catéter.

Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" significa separado de constituyentes, celulares y de otro modo, en que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos, están asociados normalmente por naturaleza. Por ejemplo, con respecto a un polinucleótido, un polinucleótido aislado es uno que está separado de las secuencias 5' y 3' con que normalmente está asociado en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos, que no se encuentran en la naturaleza, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contrapartida que se encuentra en la naturaleza.

Como se usa en la presente memoria, una "célula objetivo" o "célula receptora" se refiere a una célula individual o célula que se desea que sea, o ha sido, un receptor de moléculas de ácidos nucleicos exógenas, polinucleótidos y/o proteínas. El término también se destina a incluir progenie de una sola célula y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en genoma o complemento de ADN total) a la célula precursora original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Se puede poner en contacto una célula objetivo con otras células (por ej., como en un tejido) o se puede encontrar circulando dentro del cuerpo de un organismo.

Como se usa en la presente memoria, un "individuo" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinas, simios, seres humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas.

Los términos "cáncer," "neoplasmo" y "tumor," se usan indistintamente y en la forma singular o plural, se refieren a células que han experimentado una transformación maligna que las hace patológicas para el organismo huésped. La transformación de las células cancerosas primarias que las hace patológicas para el organismo huésped. Las células cancerosas primarias (esto es, las células obtenidas cerca del sitio de la transformación maligna) se pueden distinguir fácilmente de las células no cancerosas por técnicas establecidas, en particular examen histológico. La definición de una célula cancerosa, como se usa en la presente memoria, incluye no sólo una célula cancerosa primaria, sino cualquier célula procedente de un antepasado de células cancerosas. Esto incluye células cancerosas metastásicas y cultivos *in vitro* y estirpes celulares procedentes de células cancerosas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "detectable de manera clínica" es uno que es detectable sobre la base de masa del tumor; por ej., por procedimientos tales como barrido CAT, formación de imágenes MR, rayos X, ultrasonidos o palpación y/o que es detectable debido a la expresión de uno o más antígenos específicos de cáncer en una muestra que se puede obtener de un paciente.

Como se usa en la presente memoria, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una disolución salina tamponada de fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes, véase Martin *Remington's Pharm. Sci.*, 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1.975)).

Una célula ha sido "transformada", "transducida" o "transinfectada" por ácidos nucleicos exógenos o heterólogos cuando se han introducido tales ácidos nucleicos en el interior de la célula. El ADN transformante puede o no estar integrado (unido mediante enlaces covalentes) con ADN cromosómico constituyendo el genoma de la célula. En las procariotas, levaduras y células de mamífero por ejemplo, el ADN transformante puede ser mantenido en un elemento episomal, tal como un plásmido. En una célula eucariota, una célula transformada de manera estable es una en que el ADN transformante ha llegado a estar integrado en un cromosoma a fin de que sea heredado por células hijas por replicación de los cromosomas. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer estirpes celulares o clones formados por una población de células hija que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células procedentes de una sola célula o ascendiente común por mitosis. Una "estirpe celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecimiento estable *in vitro* por muchas generaciones (por ej., al menos aproximadamente 10).

Como se usa en la presente memoria, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para afectar a resultados beneficiosos o deseados, por ej., tales como una cantidad eficaz de transferencia y/o expresión de ácidos nucleicos y/o la obtención de un punto final terapéutico deseado. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosis. En un aspecto, una cantidad eficaz de un vector de suministro de ácidos nucleicos es una cantidad suficiente para transformar/transducir/transinfectar al menos una célula en una población de células que comprende al menos dos células.

Como se usa en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en la presente memoria para querer decir una cantidad suficiente para prevenir, corregir y/o normalizar una respuesta fisiológica anormal. En un aspecto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para reducir por al menos aproximadamente 30 por ciento, más preferiblemente por al menos 50 por ciento, lo más preferiblemente por al menos 90 por ciento, una característica significativa de manera clínica de patología, tal como por ejemplo, tamaño de una masa de tumor, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fiebre o recuento de glóbulos blancos, etc.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término incluye anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos (por ej., anticuerpos biespecíficos). Un "sitio de combinación de anticuerpos" es esa porción estructural de una molécula de anticuerpo formada por regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que se une específicamente a antígeno. Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y esas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluyendo porciones Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), porciones que se prefieren para uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria.

Un "epítipo" es una estructura, constituida normalmente por una secuencia peptídica corta u oligosacárido, que es reconocido de manera específica o se une de manera específica mediante un componente del sistema inmunitario. Los epítipos de células T se ha demostrado en general que son oligopéptidos lineales. Dos epítipos se corresponden entre sí si se pueden unir de manera específica por el mismo anticuerpo. Dos epítipos se corresponden entre sí si son capaces los dos de unirse al mismo receptor de células B o al mismo receptor de células T y que la unión de un anticuerpo a su epítipo evita sustancialmente la unión por el otro epítipo (por ej., se une menos de aproximadamente 30%, preferiblemente, menos de aproximadamente 20% y más preferiblemente, menos de aproximadamente 10%, 5%, 1% o aproximadamente 0,1% del otro epítipo).

El término "material antigénico" como se usa en la presente memoria cubre cualquier sustancia que provoque una respuesta inmunitaria innata o adaptable.

El término "célula presentadora de antígeno" como se usa en la presente memoria se dirige a cualquier célula que presente en su superficie un antígeno junto con una molécula de complejo de histocompatibilidad principal o porción de la misma, o, alternativamente, una o más moléculas del MHC no clásicas, o una porción de las mismas. Ejemplos de las APC adecuadas se discuten con detalle a continuación e incluyen, pero no se limitan a, células completas tales como macrófagos, células dendríticas, células B, las APC híbridas y células presentadoras de antígenos de acogida.

Como se usa en la presente memoria una "célula presentadora de antígeno lograda por ingeniería" se refiere a una célula presentadora de antígeno que presenta un resto molecular no natural en su superficie. Por ejemplo, dicha célula puede no tener de manera natural un coestimulador en su superficie o puede presentar coestimulador artificial adicional además de coestimulador natural en su superficie, o puede expresar una molécula de clase II no natural en su superficie.

Como se usa en la presente memoria, "células efectoras inmunitarias" se refiere a células capaces de unirse a un antígeno y que median una respuesta inmunitaria. Estas células incluyen, pero no se limitan a, células T, células B, monocitos, macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos (los CTL, por sus siglas en inglés), por ejemplo estirpes CTL, clones CTL y los CTL de infiltrados de tumor, inflamatorios u otros.

Una población "aislada" o "purificada" de células está sustancialmente exenta de células y materiales con que se asocia por naturaleza. Por APC sustancialmente exentas o sustancialmente purificadas se quiere decir que al menos el 50% de la población son las APC, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% e incluso más preferiblemente al menos 90% exento de células no APC con que están asociados por naturaleza.

Como se usa en la presente memoria, una "modificación genética" se refiere a cualquier adición, delección o ruptura molecular para los nucleótidos normales de la célula. Cualquier método que pueda conseguir la modificación genética de las APC está dentro del espíritu y alcance de esta invención. Los métodos reconocidos en la técnica incluyen transferencia de genes mediada por virus, transferencia mediada por liposomas, transformación, transfección y transducción, por ej., transferencia de genes mediada por virus tal como el uso de vectores basados en virus de ADN tales como adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus, así como vectores con base retroviral.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otro modo, biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la destreza de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ej., Maniatis, Fritsch & Sambrook, En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1.982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D. N. Glover, ed., 1.985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1.984); Hibridación de Ácidos Nucleicos (eds., B. D. Hames & S. J.

Higgins, 1.985); *Transcription and Translation* (eds., B. D. Hames & S. I. Higgins, 1.984); *Animal Cell Culture* (ed., R. I. Freshney, 1.986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1.986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1.984).

5 Vacunas Quiméricas

En la Patente de EE.UU. 5.633.234 se ligaron secuencias antigénicas a dominios citoplasmáticos de LAMP, dominios transmembrana y secuencias de señal para formar "quimeras antígeno/LAMP". Se encontró que estas quimeras se dirigen a una ruta de transporte endosomal/lisosomal. Con diversas proteínas de membrana, se encontró que las quimeras antígeno/LAMP provocaban una respuesta inmunitaria mucho mayor que el antígeno natural.

Esta propuesta se ha demostrado útil en el aumento de respuestas celulares y humores a diversos antígenos del virus, papilomavirus humano E7, proteína de membrana del virus del dengue, proteína de membrana gp160 de VIH-1, Gag p55 VIH-1, proteína de membrana de West Nile, proteína NS3 del virus de la hepatitis C y citomegalovirus pp65 (véase, por ej., Bonini, et al., *J. Immunol.* 166: 5.250-5.257, 2.001). La respuesta inmunitaria aumentada se puede atribuir a co-localización de LAMP con MHC II y el tratamiento más eficaz y suministro de péptidos antigénicos. Además, se indica que el objetivo LAMP da como resultado la presentación de un número aumentado de epítopos inmunógenos, induciendo así una respuesta inmunitaria cualitativamente ampliada comparado con antígeno no fijado como objetivo. Por ejemplo, Fernandes et al., 2.000, *Eur. J. Immunol.* 30 (8): 2.333-43, demostraron un aumento en el número de péptidos presentados de un antígeno OVA transportado de LAMP codificados en un vector de vaccinia. De los 12 péptidos generados a partir de OVA suministrados de manera exógena, 9 fueron presentados por una quimera OVA/LAMP, cuando se compara con sólo 2 por la construcción sin LAMP.

Sin embargo, aunque el dominio citoplasmático de LAMP es necesario (junto con una secuencia de señal y dominio transmembrana), no es suficiente para transporte endosomal/lisosomal. Es el descubrimiento de la presente invención que también se requieren secuencias del dominio luminal de una proteína de membrana asociada lisosomal tal como un polipéptido de LAMP para el transporte de algunas proteínas para la ruta vesicular lisosomal.

Por ejemplo, las proteínas de cápside vírica o no estructurales y otras proteínas no están presentes normalmente en una estructura de membrana, no se ubican en un compartimento vesicular ocupado por LAMP y MHC II y no provocan una respuesta inmunitaria aumentada. Es evidente que el transporte de proteínas en una ruta vesicular requiere más de una señal objetivo, probablemente secuencias que están implicadas en el plegamiento de las proteínas e interacciones con otras proteínas que están implicadas en el transporte vesicular de las proteínas.

Por lo tanto, la invención proporciona quimeras que comprenden un antígeno y secuencias lumenales de un polipéptido que da como resultado el transporte de la quimera al compartimento endosomal/lisosomal para tratamiento del antígeno y asociación de epítopos de antígeno con MHC II. En un aspecto, la proteína quimérica comprende adicionalmente secuencias objetivo citoplasmáticas que dirigen la quimera a compartimentos endosomales/lisosomales. Adicionalmente, la proteína quimérica también puede comprender una secuencia de señal y/o una secuencia transmembrana. Se proporcionan dominios de transporte adecuados por LAMP-1, LAMP-2, DC-LAMP, Trp-1, DEC-205, gp200-MR6 y otros polipéptidos, como se discute a continuación. La secuencia señal y la secuencia transmembrana pueden ser, pero no tienen que ser, de estos polipéptidos. Sin embargo, en un aspecto, una quimera antígeno/LAMP comprende un polipéptido de LAMP de longitud completa.

Secuencias codificadoras de antígeno

La presente invención es aplicable extensamente a materiales antigénicos que tengan uso en las vacunas o en otros contextos. Este material antigénico contendrá en general segmentos peptídicos que se pueden liberar por enzimas lisosomales y, cuando se liberan, corresponden a epítopos de clase II del MHC. El material antigénico también puede contener regiones que estimulen otros componentes del sistema inmunitario, incluyendo todas las respuestas de las inmunoglobulinas y las respuestas del MHC I.

Debido a que las construcciones de la presente invención atraviesan los compartimentos de modificación post-traduccionales previamente al transporte al compartimento lisosomal, el dominio antigénico también puede incluir epítopos que resultan de modificación celular. Esencialmente, cualquier polipéptido que se pueda sintetizar por una célula de mamífero y que contenga epítopos de células B y T incorporados a los dominios antigénicos, directamente en la secuencia de aminoácidos primaria o en señales que dirijan su creación durante el tratamiento post-traduccionales se puede usar como fuente de material antigénico.

La selección de la porción más apropiada de la proteína antígeno deseada para uso como el dominio antigénico se puede hacer por identificación sistemática funcional. En general, este método de identificación sistemática implica la clonación de ADN que codifica uno o más segmentos del antígeno proteína y al menos un dominio para el transporte de la quimera al compartimento endosomal/lisosomal para tratamiento del antígeno y asociación del epítopo de

antígeno con MHC II. Preferiblemente, dicha construcción incorporará una o más secuencias de ADN codificadoras de una secuencia señal y/o dominio transmembrana y/o dominio objetivo citoplasmático (por ej., tal como la cola citoplasmática de un polipéptido de LAMP). El ADN clonado se expresa, preferiblemente en una estirpe celular presentadora de antígeno (pero no necesariamente una célula presentadora de antígeno profesional).

El procedimiento de identificación sistemática particular depende del tipo de antígeno y los ensayos para su actividad antigénica. La antigenicidad se puede medir por estimulación de estirpes celulares T o clones específicos de clase II del MHC específicos. Alternativamente, la antigenicidad se puede determinar por medición de la capacidad para generar anticuerpos o células T específicas para el antígeno *in vivo*. Estos y otros ensayos de actividad antigénica son conocidos para los expertos en la materia.

Los antígenos que pueden servir como fuente de material antígeno preferido incluyen antígenos tumorales, auto-antígenos, antígenos de trasplante, proteínas de superficie de la célula encontrados en células de mamíferos, proteínas específicas de cáncer, proteínas asociadas a respuestas fisiológicas anormales, proteínas de bacterias, protozoos u hongos, incluyendo especialmente proteínas encontradas en las paredes celulares o membranas celulares de estos organismos y proteínas codificadas por los genomas de virus incluyendo retrovirus tales como VIH y hepadnavirus.

Los antígenos preferidos en particular son antígenos codificados por los genomas de organismos causativos de, o asociados con, hepatitis, rabias, malaria, infecciones parasitarias (por ej., tales como esquistosomiasis), cáncer, SIDA, fiebre amarilla, fiebre del dengue, encefalitis Japonesa, Fiebre del Nilo Occidental, sarampión, viruela, ántrax, Ebola, encefalitis equina, fiebre del valle de Rift, fiebre por arañazo de gato, meningitis vírica, plaga, tularemia y enfermedades causadas por otros organismos patógenos. Los antígenos víricos preferidos en particular son proteínas codificadas de manera vírica codificadas por el genoma de virus patógenos para hombres, caballos, vacas, cerdos, llamas, jirafas, perros, gatos o pollos. Ejemplos no limitantes incluyen péptidos de la nucleoproteína de la gripe constituidos por restos 365-80 (NP365-80), NP50-63 y NP147-58 y péptidos de hemaglutinina de gripe HA202-21 y HA523-45, definidos previamente en ensayos de citotoxicidad restringida de clase I (Perkins et al., 1.989, *J. Exp. Med.* 170: 279-289). Se han descrito péptidos que representan epítomos indicados por el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* (véase, por ej., la patente de EE.UU. N° 5.609.872).

Los materiales antigénicos también pueden incluir auto-antígenos reconocidos en rechazo de trasplantes, alergias, respuestas de hipersensibilidad y trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, el receptor de acetilcolina (AChR) que se reconoce en la miastenia grave, puede proporcionar una fuente de materiales antigénicos. Otra clase de auto-antígenos para los que se han descrito epítomos antigénicos es subunidad beta de gonadotropina coriónica humana (hCG) (véase, por ej., la patente de EE.UU. N° 5.733.553). Estos epítomos encuentran utilidad en métodos anticonceptivos.

También se pueden usar antígenos sintéticos y antígenos modificados en los métodos descritos en la presente memoria. Los epítomos de péptidos antigénicos sintéticos tienen secuencias de aminoácidos modificadas relativas a sus contrapartes naturales. Además incluido por el término péptido antigénico sintético" están multímeros (concatémeros) de péptidos antigénicos sintéticos, opcionalmente incluyendo intervención de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, los epítomos de péptidos antigénicos sintéticos de la presente invención se pueden diseñar basándose en secuencias de aminoácidos conocidas de epítomos de péptidos antigénicos.

Otros antígenos preferidos en particular incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido codificado de VIH tal como polipéptidos Gag, Env, Rev, Tat y/o Nef, gp160 y similares; antígeno de núcleo de virus del papiloma; proteínas estructurales y no estructurales de HCV y proteínas estructurales y no estructurales de CMV.

También se incluyen dentro del alcance de la invención péptidos antigénicos que son modificados de manera diferencial durante o después de la traducción, por ej., por fosforilación, glicosilación, reticulación, acilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo, molécula de la membrana u otro ligando, (Ferguson et al., *Ann. Rev. Biochem.* 57: 285-320, 1.998).

También se pueden identificar nuevos antígenos y nuevos epítomos usando métodos conocidos en la técnica. Cualquier método convencional, por ej., biblioteca sustractiva, análisis comparativos Northern y/o Western de células normales y tumorales, Análisis en Serie de Expresión Genética (patente de EE.UU. N° 5.695.937) y SPHERE (descrito en la patente internacional PCT WO 97/3 5 03 5), se pueden usar para identificar antígenos putativos para uso.

Por ejemplo, la clonación de la expresión como se describe en Kawakami et al., 1.994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3.515-19, también se puede usar para identificar nuevos antígenos asociados a tumores. En pocas palabras, en este método, una biblioteca de los ADNc que corresponde a ARNm procedentes de células tumorales es clonada en un vector de expresión e introducida en células objetivo que se incuban con posterioridad con células T citotóxicas. Los conjuntos de los ADNc que pueden estimular las respuestas de Células T se identifican y por un procedimiento de dilución secuencial y ensayo de nuevo de conjuntos menos complejos de ADNc, se identifican secuencias de ADNc

únicas que pueden estimular las células T y codifican así un antígeno tumoral. La especificidad tumoral de los ARNm correspondientes se puede confirmar por análisis comparativos Northern y/o Western de células normales y tumorales.

Se puede emplear el análisis SAGE para identificar los antígenos reconocidos por células efectoras inmunitarias expandidas tales como los CTL, por identificación de las secuencias de nucleótidos expresadas en las células que expresan antígeno. El análisis SAGE empieza con proporcionar ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de una población que expresa antígeno y células que no expresan el antígeno. Ambos ADNc se pueden ligar a sitios del cebador. Después se crean etiquetas de secuencias, por ejemplo, usando cebadores apropiados para multiplicar el ADN. Midiendo las diferencias en estas series de etiquetas entre los dos tipos de células, se pueden identificar las secuencias que se expresan de manera anormal en la población de células que expresan antígeno.

Otro método para identificar epítomos óptimos y nuevos péptidos antigénicos es una técnica conocida como Recuperación de Epítomo en Fase Sólida ("SPHERE, por sus siglas en inglés"). Este método se describe con detalle en la patente internacional PCT WO 97/35035. Aunque se usa para identificar sistemáticamente epítomos CTL restringidos de clase I del MHC, se puede modificar el método para identificar sistemáticamente epítomos de clase II por identificación sistemática de la estimulación de estirpes celulares T específicas de clase II del MHC específicas de antígeno, por ejemplo, más bien que CTL. En SPHERE, las bibliotecas de péptidos se sintetizan sobre perlas, donde cada perla contiene un péptido único que se puede liberar de una manera controlada. Los péptidos eluidos se pueden mezclar para proporcionar pozos con cualquier complejidad deseada. Después de escisión de un porcentaje de los péptidos de las perlas, en éstos se ensaya su capacidad para estimular una respuesta de Clase II, como se describió anteriormente. Después se descodifican perlas individuales positivas, que identifican la secuencia de aminoácidos reactivos. El análisis de todos los positivos proporcionará un perfil parcial de epítomos sustituidos de manera conservadora que estimule la respuesta de células T que se está ensayando. El péptido se puede volver a sintetizar y volver a ensayar para verificar la respuesta. También, se puede sintetizar una segunda biblioteca (de complejidad mínima) con representaciones de todas las sustituciones conservadoras para enumerar el espectro completo de derivados tolerados por una respuesta particular. Por identificación sistemática de estirpes celulares T múltiples, se puede facilitar la búsqueda de epítomos de reacción cruzada.

Se pueden sintetizar péptidos aislados usando un procedimiento sintético de estado sólido apropiado (Steward and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freemantle, San Francisco, CA 1.968). Un método preferido es el procedimiento Merrifield (Merrifield, *Recent Progress in Hormone Res.* 23: 451,1.967). La actividad antigénica de estos péptidos se puede ensayar de manera conveniente usando, por ejemplo, los ensayos como se describe en la presente memoria.

Una vez que se obtiene un péptido aislado, se puede purificar por métodos estándar incluyendo cromatografía (por ej., cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de columna por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para purificación de proteínas. Para cromatografía de inmunoafinidad, se puede aislar un epítomo uniéndolo a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que fueron producidos contra ese péptido o un péptido relacionado, y fueron fijados a un soporte estacionario. Alternativamente, las etiquetas de afinidad tales como hexa-His (Invitrogen), dominio de unión de Maltosa (New England Biolabs), secuencia de recubrimiento de gripe (Kolodziej, et al., *Methods Enzymol.* 194: 508-509,1.991) y glutatión-S-transferasa se pueden unir a los péptidos para permitir la fácil purificación por pase por una columna de afinidad apropiada. Los péptidos aislados también se pueden caracterizar físicamente usando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

Una vez aislada e identificada la secuencia peptídica de un epítomo deseado, se pueden secuenciar fácilmente las secuencias que comprenden los ácidos nucleicos que codifican estos epítomos.

Secuencias de transporte endocítico

Los datos disponibles sugieren la siguiente secuencia de casos en el transporte intracelular de moléculas de clase II del MHC: las moléculas de la clase II del MHC se ensamblan con la cadena invariante en el retículo endoplasmático y son transportadas por el Golgi en común con otras proteínas de membrana incluyendo clase I de MHC. Las moléculas son fijadas después como objetivo a organelos endosomales/lisosomales específicos por un mecanismo desconocido, segregación de las moléculas de clase I del MHC que siguen una ruta constitutiva a la superficie de la célula. En la ruta endocítica/lisosomal, la cadena invariante se retira de la clase II del MHC mediante proteasas que actúan en un entorno ácido. Al mismo tiempo, se generan fragmentos antigénicos de proteínas que han entrado en la ruta endocítica/lisosomal mediante estas proteasas y los péptidos resultantes se unen a las moléculas de clase II y son transportados a la superficie celular.

La biosíntesis y los mecanismos de fijación como objetivo vacuolar de las enzimas hidrolíticas presentes en el compartimento lisosomal/endosomal han sido estudiados de manera extensa (Komfeld and Mellman, *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 483,1.989). Las hidrolasas recién sintetizadas en el aparato de Golgi adquieren grupos manosa 6-fosfato que sirven como marcadores de reconocimiento específicos para la unión de estas enzimas a receptores de manosa 6-

fosfato que han sido elegidos como objetivo de alguna manera desconocida para una vacuola prelisosomal. Allí, el complejo receptor-enzima se disocia mediante pH bajo y los receptores se reciclan al aparato de Golgi, al tiempo que la vacuola que contiene la enzima madura en un lisosoma.

La localización de las glicoproteínas de membrana lisosomal se controla mediante un mecanismo objetivo independiente de la ruta del receptor de manosa-6-fosfato definido (MPR) para enzimas lisosomales hidrolíticas (Kornfeld and Mellman, 1.989, supra). Estudios recientes describen un compartimento vesicular distinto con propiedades lisosomales y caracterizados por alta concentración de proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1) y moléculas de clase II del MHC (Peters, et al., *EMBO J.* 9: 3.497,1.990). El análisis Cinético del Compartimento Lisosomal/Endosomal de transporte intracelular y fijación como objetivo de LAMP-1 recién sintetizada y otras proteínas similares indican que la molécula se sintetiza en el retículo endoplasmático, se trata en las cisternas de Golgi y se transportada a los lisosomas a una hora de su biosíntesis, sin acumulación detectable en la membrana plasmática (Barriocanal, et al., *J Biol Chem.* 15: 261 (35): 16.755-63, 1.986; D'Sousa, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 522, 1.986; Green, et al., *J. Cell Biol.*, 105: 1.227, 1.987).

Los estudios de la estructura y la función de la membrana lisosomal se iniciaron en 1.981 por August y colaboradores con el descubrimiento de glicoproteínas celulares principales que se denominaron con posterioridad proteínas de membrana asociadas a lisosomas uno y dos (LAMP-1 y LAMP-2) debido a su localización predominante en la membrana lisosomal (Hughes, et al., *J. Biol. Chem.* 256: 664, 1.981; Chen, et al., *J. Cell Biol.* 101 :85, 1.985). Se identificaron con posterioridad proteínas análogas en células de rata, pollo y humanas (Barriocanal, et al., 1.986, supra; Lewis, et al., *J. Cell Biol.* 700: 1.839, 1.985; Fambourgh, et al., *J. Cell Biol.* 106: 61,1.988; Mane, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 360, 1.989).

Típicamente, LAMP-1, como se deduce de un clon de ADNc (Chen, et al., *J. Biol. Chem.* 263: 8.754,1.988) consiste en un núcleo de polipéptido de aproximadamente 382 aminoácidos con un dominio amino-terminal luminal (residuo-346) grande seguido por una región transmembrana hidrófoba de 24 residuos y cola citoplasmática carboxi-terminal (12 residuos) corta. El dominio luminal está muy glicosilado, estando sustituido con aproximadamente 20 oligosacáridos de tipo complejo ligados a asparagina y consiste en dos a aproximadamente 160 unidades de homología de 160 residuos que se separan por una región rica en prolina/serina. Cada uno de estos dominios homólogos contiene 4 residuos de cisteína espaciados de manera uniforme, unidos por disulfuro para formar 36-38 bucles de residuos colocados de manera simétrica dentro de las dos mitades del dominio luminal (Arterbum, et al., *J. Biol. Chem.* 265: 7.419, 1.990; véase, también Chen, et al., *J. Biol. Chem.* 25: 263 (18): 8.754-8, 1.988). La molécula de LAMP-2 es muy similar a LAMP-1 en la secuencia de aminoácidos completa (Cha, et al., *J. Biol. Chem.* 265: 5.008, 1.990).

LAMP-1 y LAMP-2 no se encuentran específicamente en las células presentadoras de antígenos (células dendríticas). Su función precisa es desconocida, pero presumiblemente están implicadas de alguna manera en la función de los lisosomas. So co-localización con MHC II en el compartimento vesicular del MHC multilaminar de las APC no presenta asociación funcional conocida para el tratamiento o la presentación de antígeno; sin embargo, los dominios citoplasmáticos de LAMP que comprenden antígenos quiméricos, como se discutió anteriormente, muestran inmunogenicidad mejorada (véase, la patente de EE.UU. 5.633.234).

La invención proporciona proteínas quiméricas que comprenden el dominio luminal de una proteína de membrana asociada lisosomal, tal como un polipéptido de LAMP, o un fragmento bioactivo o forma modificada del mismo (conjuntamente referido como "un dominio luminal de LAMP"). En un aspecto, el dominio luminal de LAMP comprende al menos dos unidades de homología. Preferiblemente, cada unidad de homología está separada por una región rica en prolina/serina. Más preferiblemente, cada dominio de homología comprende 4 residuos de cisteína capaces de formar cuatro bucles de 36-38 residuos colocados de manera simétrica dentro de las dos mitades del dominio luminal cuando se une disulfuro junto. Lo más preferiblemente, el dominio luminal comprende secuencias necesarias para fijar como objetivo y transportar un polipéptido al que está unido (por ej., mediante un enlace químico) a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas para unirse a una molécula de clase II del MHC o para el suministro a otro compartimento/organelo donde se unirá a una molécula de clase II del MHC.

En otro aspecto, la proteína quimérica adicionalmente, o alternativamente, comprende una señal basada en dileucina que comprende al menos un par leucina-leucina o al menos un par leucina/isoleucina. Preferiblemente, la proteína comprende además un residuo ácido 4-5 residuos arriba del par. Más preferiblemente, este dominio de señal se une a un polipéptido de complejo AP (véase, por ej., Bonafacino and Dell'Angelica, *J. Cell Biol.* 145: 923-926,1.999). Se pueden encontrar dominios a base de dileucina adecuados en tirosinasa (TM-X₁₀-EKQPLL-X₅-YHSL-X₅); TRP-2 (TM-X₇-EANQPLL-X₁₂) y Pmel7 (TM-X₃₄-ENSPLL-X₅) y proteína P (véase, por ej., Dell'Angelica, 2.000, supra), por ejemplo.

En un aspecto preferido, la proteína quimérica también comprende un dominio citoplasmático para fijar como objetivo y/o transportar una proteína quimérica a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas. En un aspecto, el dominio citoplasmático comprende la cola de un polipéptido de LAMP. La secuencia de

once aminoácidos de la cola citoplasmática de LAMP-1 y otras glicoproteínas de la membrana lisosomal similares presenta la siguiente secuencia: Arg-Lys -Arg-Ser-His -Ala -Gly-Tyr -Gln -Thr -Ile -COOH (Chen, et al., 1.988, *supra*). En LAMP-1, estas secuencias son de 372-382 aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

Las secuencias de cola citoplasmática conocidas de proteínas de la membrana lisosomal, LAMP-1 (Chen, et al., 1.988, *supra*), LAMP-2 (Cha, et al., 1.990, *supra*) y CD63 (Hotta, et al., *Cancer Res.* 48: 2.955, 1.988), han sido alineadas por los autores con la señal de internalización que contiene Tyr en la cola citoplasmática de LAP (Pohlman, et al., *EMBO J.* 7: 2.343, 1.988) en la Tabla 1. Se sabe que el residuo Tyr es requerido para objetivo endosomal/lisosomal y se demostró en la patente de EE.UU. 5.633.234 que la secuencia completa requerida para fijar como objetivo otras moléculas a lisosomas requiere la secuencia Tyr-X-X-hyd (es decir, una "unidad Tyr), un Tyr seguido por dos aminoácidos seguido por un residuo hidrófobo.

Tabla 1. Secuencias de Cola Citoplasmática de las Proteínas de la Membrana Lisosomal Principal*

LAMP-1:	RKRSHA GYOTI
LAMP-2:	KHHA GYEOF
CD63:	KSIRS GYEVN
LAP:	RMEAPP GYRHVADGQDHA

*Se subraya la unidad del residuo hidrófobo Gly-Tyr-X-X conservado en el dominio citoplasmático de las proteínas de la membrana lisosomal descritas, donde X es cualquier aminoácido. La secuencia de la cola citoplasmática completa de las proteínas enumeradas se muestra a partir de la región transmembrana al carboxilo terminal.

La importancia de un residuo hidrófobo en o cerca de la posición del carboxilo terminal se muestra por los resultados obtenidos de la modificación de la secuencia Tyr-Gln-Thr-Ile de LAMP-1. Las moléculas de ADNc mutantes en que se substituyó Ile con otros dos residuos hidrófobos, Leu o Phe y un residuo polar, Thr. Sustituir Leu (Tyr-Gln-Thr-Leu) y Phe (Tyr-Gln-Thr-Phe) no afecta al objetivo lisosomal, mientras que la proteína mutante que contiene Thr (Tyr-Gln-Thr-Thr) se acumula en la superficie de la célula. Los mutantes que contienen Gln sustituidos por Ala (Tyr-Ala-Thr-Ile), Thr (Tyr-Gln-Ala-Ile) y ambos residuos (Tyr-Ala-Ala-Ile) no tienen efecto en la fijación como objetivo de la membrana lisosomal, que indica que estas posiciones pueden ser ocupadas por residuos polares, o no polares, cargados.

La señal objetivo preferida para el compartimento lisosomal/endosomal, por lo tanto, incluye una secuencia de tetrapéptidos situada en el dominio citoplasmático, cerca del dominio transmembrana y también cerca del C-terminal. El dominio citoplasmático es preferiblemente una secuencia de aminoácidos corta (menos de 70 aminoácidos, preferiblemente menos de 30 aminoácidos, lo más preferiblemente menos de 20 aminoácidos) que termina en un grupo carboxilo libre. En una realización más preferida, el tetrapéptido está en el extremo C-terminal de una cola citoplasmática corta que contiene la señal objetivo o está en un contexto similar a LAMP-1.

Una secuencia de cuatro aminoácidos adecuada para el tetrapéptido se puede obtener por sustituciones de aminoácidos, siempre que la unidad consista en Tyr-X-X-Hyd (donde X puede ser cualquier aminoácido y Hyd indica un aminoácido hidrófobo) y se conserva la capacidad para conferir fijación como objetivo lisosomal/endosomal. Un tetrapéptido preferido en particular tiene la secuencia Tyr-Gln-Thr-Ile. En la realización más preferida, la cola citoplasmática de LAMP completa junto con su dominio transmembrana y lo más preferiblemente, su dominio luminal está acoplado a la secuencia primaria del dominio antigénico para tratamiento y presentación de clase II del MHC altamente eficaz. Sin embargo, el dominio citoplasmático no es necesario para facilitar el transporte siempre que se proporcione un dominio luminal de un polipéptido de LAMP.

En otro aspecto, el dominio objetivo endosomal comprende una secuencia transmembrana. Muchas proteínas que servirán como la fuente del dominio antigénico para construcciones estimuladoras inmunitarias particulares serán antígenos superficiales que incluyan un dominio transmembrana en su secuencia primaria. Dicho dominio transmembrana puede ser retenido y el dominio citoplasmático reemplazado con un dominio objetivo lisosomal/endosomal como se explicó en la presente memoria (por ej., un dominio que comprende un dominio luminal de LAMP).

En un aspecto preferido, el dominio transmembrana de LAMP (véase, Chen, et al., *J. Biol. Chem.* 263: 8.754, 1.988) está acoplado a la secuencia primaria de un dominio antigénico deseado y la secuencia del dominio luminal. La estructura de un dominio transmembrana en un polipéptido es conocida en la técnica (véase, por ej., Bangham, *Anal. Biochem.* 174: 142, 1.988; Klein, et al., *Biochem. Biophys. Acta* 815: 468, 1.985; Kyle & Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157: 105, 1.982). Normalmente la región transmembrana aparece en la secuencia primaria como una secuencia de 20-25 restos de aminoácidos hidrófobos flanqueados por más regiones hidrófilas. Dichas secuencias se pueden

encontrar, por ejemplo, en la mayoría de las secuencias de antígenos de la superficie de la célula enumeradas por Genbank así como muchas otras proteínas de membrana. La secuencia transmembrana particular no es crítica, siempre que sirva para conectar el dominio antigénico al dominio luminal y cola citoplasmática y ancla la construcción en el compartimento membranoso.

Las unidades de clasificación adicionales, o alternativas, pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más de: un dominio objetivo, un dominio de unidades de tirosina como se describió anteriormente; un dominio basado en dileucina y tirosina; un dominio rico en prolina y dominio S-V-V (véase, por ej., Blott and Grifitts, *Nature* 3: 122-131, 2.002). *Endocytic Receptor Sequences*

El acceso de los antígenos al compartimento vesicular del MHC II de células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, es normalmente por endocitosis de antígenos extraños. Es el descubrimiento de la invención inmediata que los dominios de transporte de receptores endocíticos se pueden usar para generar polipéptidos quiméricos para transportar antígenos a compartimentos endosomales/lisosomales o a organelos relacionados con lisosomas para asociación con moléculas del MHC de clase II y tratamiento posterior.

En un aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un antígeno ligado a un dominio de transporte de un receptor endocítico (por ej., vía fusión en el marco de secuencias de ácidos nucleicos que codifican el dominio de transporte y antígeno). El dominio de transporte localiza el antígeno en un compartimento endosomal/lisosomal o a un organelo relacionado con lisosomas para asociación con una molécula de clase II del MHC en el compartimento/organelo o en un compartimento posterior al que se suministra el antígeno.

Los receptores endocíticos según la invención, incluyen, pero no se limitan a, receptores para microorganismos, receptores Fc (por ej., CD64, CD32, CD16, CD23 y CD89); receptores complemento (por ej., CR1 o CD35, CR3, CR4); receptores eliminadores o receptores que se unen a lipoproteínas acetiladas o modificadas, polirribonucleótidos, lipopolisacáridos y partículas de sílice (por ej., tal como SRA, MARCO), integrinas (CD49e/CD29; CD49d/CD29; CD51/CD61); lectinas (por ej., tales como dectina-1, lectinas de tipo C y similares) y receptores tipo Toll (por ej., los TLR). Para una revisión de dichos receptores, véase Underhill and Ozinsky, *Annu. Rev. Immunol.* 20: 825-52, 2.002, por ejemplo.

En un aspecto, el receptor endocítico se obtiene de una célula presentadora de antígeno profesional tal como una célula dendrítica. Se ha identificado un número de receptores endocíticos de células dendríticas, incluyendo el receptor de manosa de los macrófagos (MMR, por sus siglas en inglés), receptor de la fosfolipasa A₂, Endo 180 y DEC-205 y su homólogo humano, gp200-MR6 (McKay, et al., 1.998). Se indica que DEC-205 difiere del MMR, al menos, porque fija como objetivo material antigénico para un compartimento endosomal/lisosomal co-localizado con LAMP y MHC II, mientras que se encuentra MMR en los endosomas periféricos que carecen de LAMP y MHC II (Mahnke, et al., *J. Cell Biol.* 151 (3): 673-684, 2.000).

DEC-205 también demuestra una presentación muy aumentada de antígeno de endocitosis a células T CD4⁺, cuando se compara con aquella por el MMR. Esta diferencia en transporte y suministro de antígeno a MH II entre las dos moléculas se indica que resulta de la presencia en la cola citosólica de DEC-205, además de la secuencia de absorción de hoyos recubiertos, de una triada EDE que está ausente en el MMR. Se mostró que se requería la porción distal de la cola citosólica que contenía la secuencia EDE para la fijación como objetivo al compartimento de endosomas/lisosomas más profundo que contenía LAMP y MHC II y no se reemplazó EDE por una secuencia AAA. Mahnke et al., 2.000, *supra*, también han demostrado que estas señales de transporte de cola citoplasmática son suficientes para transportar y reciclar una quimera CD 16 al sitio MHC II/LAMP y para mediar un aumento de 100 veces en la presentación de antígenos.

La similitud de las secuencias entre DEC-205 y gp200-MR6, en particular, en el dominio citoplasmático, hace esta secuencia una secuencia de transporte adecuada también. Además, se ha demostrado que gp200-MR6 presenta la propiedad importante adicional de regulación de IL-4. McKay et al., *Eur J Immunol.* 28 (12): 4.071-83, 1.998, han demostrado que la ligadura de gp200-MR6 puede imitar IL-4 y presentan una influencia pro-maduración, antiproliferativa, dentro del sistema inmunitario, causando la regulación hacia arriba de moléculas coestimuladoras en linfocitos B.

Es un descubrimiento de la invención inmediata, sin embargo, que las fusiones de DEC-205 con LAMP no se transportan al compartimento endosomal pero más bien se localizan en la superficie de la célula. Las proteínas quiméricas que combinan dominios de LAMP, una secuencia de antígenos que contiene al menos un epítipo y los dominios de receptores endocíticos tales como dominios DEC-205, sin embargo, son capaces de transportarse a compartimentos endosomales, que se co-localizan con LAMP endógeno.

Por lo tanto, en un aspecto preferido, una proteína quimérica de la invención comprende un dominio luminal de un polipéptido de membrana lisosomal (por ej., tal como un dominio luminal de LAMP) y el dominio objetivo de un receptor endocítico (por ej., tal como polipéptido DEC-205 o gp 200-MR6). Dichas construcciones no sólo muestran el objetivo correcto sino la antigenicidad mejorada también. En un aspecto más, se proporciona tanto el dominio

objetivo como de transporte de un receptor endocítico junto con el dominio de los antígenos que comprende al menos un epítipo. Las proteínas quiméricas pueden comprender adicionalmente, o alternativamente, el dominio luminal de un receptor endocítico. En aún un aspecto más, una proteína quimérica puede comprender un polipéptido receptor endocítico de longitud completa junto con el dominio antigénico que comprende al menos un epítipo.

En un aspecto, el dominio objetivo del receptor endocítico comprende el dominio citoplasmático de 31 aminoácidos de un polipéptido DEC (véase, por ej., Manhke, et al., 2.000, *supra*). En otro aspecto, el dominio objetivo comprende los residuos 7-9 de la cola citoplasmática de DEC-205. Preferiblemente, el dominio comprende una unidad Tyr. Más preferiblemente, el dominio objetivo también comprende los residuos 18-27 de la cola citoplasmática de DEC-205. En un aspecto más, el dominio objetivo comprende un dominio de EDE. La secuencia de DEC-205 es proporcionada en Kato, et al., *Immunogenetics* 47 (6): 442-50, 1.998, mientras que la de gp200-MR6 es proporcionada en McKay, et al., 1.998, *supra*, por ejemplo.

La proteína quimérica puede comprender adicionalmente un dominio objetivo citoplasmático para fijar como objetivo un polipéptido a un compartimento endosomal/lisosomal o un organelo relacionado con lisosomas (por ej., tal como un dominio de LAMP citoplasmático) así como uno o más de los otros dominios descritos anteriormente (por ej., secuencia señal, secuencia transmembrana, etc.). Como anteriormente, las unidades de clasificación adicionales, o alternativas, pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más del dominio M6P; un dominio de unidades tirosina; un dominio basado en di-leucina y tirosina; un dominio rico en prolina y dominio S-V-V (véase, por ej., Blott and Griffts, *Nature* 3: 122-131, 2.002).

Composiciones de vacuna

Los tumores vuelven a expresar genes del desarrollo o embrionarios que no se expresan en células normales en el individuo. El principal impulso de la inmunoterapia del cáncer es la identificación de antígenos específicos de tumores y el desarrollo de estrategias de inmunización que generen lo más eficazmente inmunidad dependiente de células T contra estos antígenos. Por ejemplo, los estudios indican que las vacunas recombinantes de virus de vacinia que contienen los genes de antígeno SV40 T o los genes E6 y E7 de HPV o nucleoproteína de la gripe protegerán a los animales contra exposiciones posteriores con células tumorales que expresan estas proteínas como antígenos tumorales. La protección está asociada a la generación de respuestas específicas del antígeno entre células T en el huésped.

Se ha identificado una serie de genes que codifican polipéptidos antigénicos específicos de los tumores. Dichos antígenos incluyen, pero no se limitan a, un antígeno de tumor, por ej., un polipéptido que comprende un epítipo procedente de gp 100, MAGE 1, MART, MUC I y proteína 1 y 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-1, TRP-2) (véase, por ej., Boon et al., *Immunol. Today* 16: 334-336, 1.998). MARTI y gp 100 son antígenos de diferenciación de melanocitos reconocidos de manera específica por linfocitos de infiltración de tumores restringidos de HLA-A2 (los TIL) procedentes de pacientes con melanoma y parecen estar implicados en la regresión de los tumores (Kawakami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 645 8-62, 1.994; Kawakami, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3.515-9).

Los productos génicos del virus Epstein-Barr EBV también codifican polipéptidos antigénicos que se expresan en los linfomas de Hodgkin así como Burkits y otros linfomas. Los productos del genoma HTLV-1 se han encontrado en células de leucemia de células T adultas, mientras que los productos génicos E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV, por sus siglas en inglés) se encuentran en las células de carcinoma cervical.

La identificación sistemática diferencial de las secuencias de ácidos nucleicos expresadas por las dos estirpes celulares se puede usar para seleccionar secuencias que codifican antígenos específicos de células cancerosas e incluso fases específicas de células cancerosas. Cuando la célula no objetivo es una célula normal, la identificación sistemática diferencial elimina o reduce las secuencias de ácidos nucleicos comunes a las células normales, evitándose de ese modo una respuesta inmunitaria dirigida a los antígenos presentes en células normales. Cuando la célula no objetivo es una célula normal, la identificación sistemática diferencial elimina o reduce las secuencias comunes a las células normales, evitándose de ese modo una respuesta inmunitaria dirigida a los antígenos presentes en las células normales.

En muchos casos, se ha demostrado que los péptidos procedentes de secuencias genéticas modificadas se pueden asociar con moléculas de clase I del MHC o clase II del MHC y se reconocen por el auxiliar apropiado o las células T citotóxicas. Las mutaciones en diversos oncogenes tales como la mutación de la posición 12 en K ras se han implicado como una modificación genética principal del cáncer de colon así como otros tumores malignos. Las mutaciones en los genes supresores de tumores, tales como P53, son extremadamente comunes en muchos tumores malignos. Adicionalmente, las reordenaciones que dan como resultado la activación de los oncogenes tal como la reordenación entre el gen BCR y abl en la leucemia mielógena crónica generan nuevas secuencias de proteínas. Por lo tanto, en un aspecto preferido de la invención, el material antigénico usado comprende un polipéptido específico de cáncer o una secuencia de polipéptidos modificada (por ej., procedente de una mutación genética y/o mutación cromosómica) o que está asociado más en general con una respuesta fisiológica anormal (por

ej., una respuesta autoinmunitaria, una reacción de hipersensibilidad, una reacción a un trasplante o injerto y similares).

Cualquier estrategia que aumente la presentación de un antígeno particular en moléculas del MHC de células presentadoras de antígenos huésped, de hecho, aumentaría el potencial de inmunización de tal estrategia basada en virus para una enfermedad tal como el cáncer u otra respuesta fisiológica anormal. Los argumentos equivalentes se pueden hacer para generación de eficacia de la vacuna aumentada para infecciones víricas tales como VIH.

Por lo tanto, en una realización, esta invención proporciona una composición de vacuna para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero a un antígeno. La composición comprende un vector de vacuna que comprende un segmento de ADN quimérico que comprende una secuencia que codifica al menos un epítipo de un antígeno. En un aspecto, la secuencia que codifica el antígeno es del dominio luminal de una proteína. Preferiblemente, el segmento de ADN incluye además una secuencia que codifica un dominio luminal de un polipéptido de membrana asociado a lisosomas (por ej., tal como un polipéptido de LAMP, homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos) o el dominio de transporte de un receptor endocítico. Preferiblemente, el dominio luminal o dominio de transporte transporta el antígeno a un compartimento endosomal/lisosomal o a un organelo relacionado con lisosomas de una célula, donde se une a una molécula de clase II del MHC o se trata para suministro a otro compartimento/organelo donde se unirá con posterioridad a una molécula de clase II del MHC. Más preferiblemente, el antígeno es tratado dentro del compartimento/organelo (o compartimento posterior al que se suministra) para generar un epítipo que se presenta en la superficie de la célula y que se une a la molécula de clase II del MHC.

El vector también puede codificar uno o más de un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático que contiene una señal objetivo endosomal/lisosomal que dirige la proteína a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas, un dominio de dileucina, una unidad Tyr; un dominio rico en prolina y dominio S-V-V.

Los dominios e pueden ser proporcionados en secuencia o separados por ácidos nucleicos que codifican polipéptidos ligadores o que codifican otras secuencias de aminoácidos con las funcionalidades deseadas (por ej., secuencias de estabilización de proteínas y similares). En general, en el caso de que se incluyan secuencias de ligador, éstas codifican los polipéptidos ligadores que oscilan de aproximadamente uno a aproximadamente 50 aminoácidos. El requerimiento mínimo del vector es que codifique una proteína quimérica con las propiedades de transporte deseadas. Dichas propiedades se pueden ensayar fácilmente usando ensayos rutina en la técnica.

Por ejemplo, se puede usar microscopía de inmunofluorescencia para confirmar el transporte de una proteína quimérica a un compartimento/organelo apropiado. Se puede usar análisis de marcado por pulso y caza de metionina [³⁵S] para controlar la síntesis y la degradación de la proteína quimérica para demostrar que las velocidades de síntesis de la proteína quimérica frente a la proteína endógena que comprende el dominio del antígeno son esencialmente iguales y/o que el tratamiento de la proteína quimérica tiene lugar de manera apropiada.

En realizaciones particulares, la proteína codificada por el segmento de ADN quimérico contiene un dominio intraluminal que comprende al menos un epítipo que es un péptido que compleja con moléculas de clase II de complejo de histocompatibilidad principal (MHC), una secuencia de transporte endosomal/lisosomal como se describió anteriormente y un dominio citoplasmático que contiene una secuencia objetivo endosomal/lisosomal. Preferiblemente, la secuencia objetivo comprende la secuencia de tetrapéptidos Tyr-Xaa-Xaa-Xbb, en la que Xbb es un aminoácido hidrófobo.

En otro aspecto, la proteína codificada por el segmento de ADN quimérico comprende un polipéptido asociado a membrana lisosomal de longitud completa, tal como un polipéptido de LAMP, homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos, que comprende secuencias fijar como objetivo y transportar material antigénico tanto unido a membrana como no unido a membrana en un compartimento endosomal/lisosomal.

Expresión mediada por quimera de proteína recombinante de Proteína Gag del VIH -1

En un aspecto, la proteína quimérica comprende un antígeno a partir de un polipéptido codificado de VIH. La inducción de respuestas inmunitarias humores y celulares potentes, incluyendo aquéllas contra genes estructurales víricos han demostrado ser cruciales para la eliminación del virus del VIH. Respuestas anti-Gag específicas de CD4 se correlacionan con la resistencia clínica aumentada para el virus en pacientes infectados con VIH y en un modelo de vacuna terapéutica en macacos infectados por el SIV. Por lo tanto, en un aspecto preferido, el dominio del antígeno de la proteína quimérica comprende un epítipo de Gag.

El Gag se conserva relativamente entre diversas cepas y subtipos de VIH y se han demostrado extensas respuestas CTL anti-Gag de revestimiento cruzado en pacientes infectados por el VIH. Estudios de individuos expuestos pero sero-negativos indican que CTL específico de Gag puede estar implicado en la protección contra el establecimiento de una infección por VIH persistente. Adicionalmente, los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ específicos de Gag son importantes en el control de la carga de virus durante la infección aguda así como durante las fases asintomáticas

de la infección. Se han descrito múltiples epítomos de Gag discretos y demuestran que median las actividades citotóxicas. Por otra parte, los niveles de respuestas proliferativas CTL específicas de p24 de personas no tratadas infectadas se correlacionaron positivamente con los niveles de CTL específicos de Gag y se correlacionaron negativamente con los niveles de ARN de VIH-1 en plasma.

La expresión del gen del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) cuando es introducido en células de mamífero está regulado estrechamente en muchos niveles. En una etapa post-transcripcional, la unión de Rev de VIH-1 a un elemento del ARNm de Gag encontrado en todos los ARNm de VIH-1 no empalmados y empalmados por separado, el elemento sensible a Rev (RRE, por sus siglas en inglés), da como resultado la exportación nuclear del ARNm y la traducción de Gag, Gag-Pol, Env, Vif, Vpr y Vpu. En ausencia de Rev, las células transfectadas con ADN que codifica Gag produce poco o nada de la proteína Gag. Rev también puede actuar para estabilizar los ARNm de VIH-1 por su efecto sobre las secuencias de inestabilidad con alto contenido en AU y su efecto en ciertas secuencias de inestabilidad de actuación cis (INS). (Para un informe reciente, véase Korsopoulou et al, 2.000, por ejemplo).

La dependencia en Rev para la expresión de la proteína Gag es un problema grave para el uso de esta proteína en el desarrollo de una vacuna a base de Gag contra VIH-1 con vectores de plásmido de ADN debido al requerimiento de proporcionar un factor accesorio para exportación nuclear de RNAm retroviral no empalmado. Se han usado diversos procedimientos por otros para superar la dependencia de Rev. Los genes de VIH-1 presentan una deriva de codones inusual, que difiere fuertemente de la de los genes humanos y la humanización de la secuencia genética se ha encontrado que aumenta la traducción de los ARNm de VIH-1 (Haas, et al, *Curr Biol.* 6 (3): 315-24, 1.996). De manera similar, la eliminación de las secuencias INS aumenta la eficacia traduccional (Schneider et al, *J Virol.* 71 (7): 4.892-903, 1.997). Otros han descrito también ciertos elementos de transporte constitutivos activos en cis (CTE, por sus siglas en inglés) presentes en las regiones no codificadoras de retrovirus y lentivirus de tipo D en simios (para una revisión véase, Cullen, *Virology* 248: 203-210, 1.998). Esta secuencia se pliega en una estructura de tallo-bucle de ARN extendida que se une a proteína asociada a transporte (TAP, por sus siglas en inglés) que activa el transporte nucleocitoplasmático del ARNm.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones para aumentar la expresión de proteína de gag de VIH-1 en ausencia de Rev de VIH-1, un producto génico requerido normalmente para sus roles en la traducción de ARNm de VIH-1 y exportación nuclear. Esta expresión de gag en células transfectadas con un plásmido de ADN de gag de VIH-1 se consigue sintetizando el gen gag como una quimera de ADN que codifica una secuencia de gag insertada en otra proteína celular altamente expresada. En un aspecto muy preferido, la secuencia de gag de VIH-1 es insertada en el dominio luminal de una proteína de membrana lisosomal, preferiblemente, adyacente a un dominio transmembrana. Dicha quimera se puede usar para desarrollar una vacuna de ADN anti-VIH-1 que comprende el gen gag.

Se pueden producir vacunas quiméricas de ADN que comprenden ácidos nucleicos que codifican secuencias de antígenos combinados con ácidos nucleicos que codifican los dominios objetivo de un receptor endocítico de DEC-205 específico de células dendríticas y los dominios de transporte luminal de LAMP. En un aspecto, el receptor endocítico es un receptor endocítico de células dendríticas, tal como DEC-205. Como se muestra en los ejemplos a continuación, DEC-205 fusionado a un dominio luminal de LAMP, gag p55 de VIH y la transmembrana y la cola citoplasmática de DEC-205 demostró la co-localización del antígeno de VIH proporcionado como parte de la proteína quimérica con la proteína de LAMP endógena. Las construcciones LAMP/Gag/DEC presentaron una inmunogenicidad equivalente para la construcción LAMP/Gag.

Conjunto de secuencias que codifican proteínas quiméricas

Los procedimientos para la construcción de proteínas quiméricas son conocidos en la técnica (véase por ej., Williams, et al., *J. Cell Biol.* 111: 955, 1.990). Las secuencias de ADN que codifican los segmentos deseados se pueden obtener a partir de materiales de ADN recombinante fácilmente disponibles tales como los disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852, U.S.A., o de bibliotecas de ADN que contienen el ADN deseado.

Dichos segmentos de ADN incluyen mínimamente: secuencias que codifican un dominio antigénico y un dominio luminal de un polipéptido asociado a membrana lisosomal para transportar un polipéptido ligado al dominio luminal a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas y/o un dominio de transporte de un receptor endocítico para transporte a un compartimento endosomal/lisosomal y/u organelo relacionado con lisosomas. Segmentos de ADN adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias que codifican: secuencias objetivo citoplasmáticas para fijar como objetivo la proteína quimérica a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas; secuencia transmembrana, secuencias señal, secuencias de di-leucina, unidades Tyr, dominios ricos en prolina, secuencias M6P, secuencias Ser-Val-Val y similares.

Los segmentos de ADN que corresponden a las secuencias de dominio deseadas se ensamblan después con

secuencias de control y señal apropiadas usando procedimientos de rutina de metodología de ADN recombinante. Véase, por ej., como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 4.593.002 y Langford, et al., *Molec. Cell. Biol.* 6: 3.191, 1.986.

Se puede sintetizar de manera química o aislar una secuencia de ADN que codifica una proteína o polipéptido por una de diversas propuestas. La secuencia de ADN que se tiene que sintetizar se puede diseñar con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos deseada. En general, se seleccionarán codones preferidos para el huésped deseado en que la secuencia se usará para expresión. La secuencia completa se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados por métodos estándar y se ensambla en una secuencia de codificación completa. Véase, por ej., Edge, *Nature* 292: 756, 1.981; Nambair, et al. *Science* 223: 1.299, 1.984; Jay, et al., *J. Biol. Chem.* 259: 6.311, 1.984.

En un aspecto, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de dominios de la proteína quimérica son aislados de manera individual usando la reacción en cadena de la polimerasa (M. A. Innis, et al., *En PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications*, Academic Press, 1.990). Los dominios son preferiblemente aislados de clones disponibles públicamente que se sabe que los contienen, pero también pueden ser aislados de ADN genómico o bibliotecas de ADNc. Preferiblemente, los fragmentos aislados están limitados por sitios de endonucleasa de restricción compatibles que permiten un ADN quimérico que codifica la secuencia de proteínas inmunogénicas que se tiene que construir. Esta técnica es conocida para los expertos en la materia. Las secuencias de dominio se pueden fusionar directamente entre sí (por ej., con secuencias no intermedias), o se insertan entre sí (por ej., en el caso de que las secuencias de dominio sean discontinuas), o se pueden separar mediante secuencias intermedias (por ej., tales como secuencias ligadoras).

Las estrategias básicas para preparar cebadores oligonucleótidos, sondas y bibliotecas de ADN, así como su identificación sistemática por hibridación de ácidos nucleicos, son conocidas para los expertos en la materia. Véase, por ej., Sambrook, et al., 1.989, *supra*; Perbal, 1.984, *supra*. La construcción de un ADN genómico o biblioteca de ADNc apropiado está dentro de la destreza de la técnica. Véase, por ej., Perbal, 1.984, *supra*. Alternativamente, las bibliotecas de ADN o los clones disponibles públicamente adecuados, están disponibles en suministradores de materiales de investigación biológica, tales como Clontech y Stratagene, así como de depósitos públicos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Se puede conseguir la selección mediante secuencias de expresión a partir de una biblioteca de expresión de ADN y detección de los péptidos expresados de manera inmunológica. Se seleccionan los clones que expresan los péptidos que se unen a moléculas del MHC II y a receptores de anticuerpos/células T deseados. Estos procedimientos de selección son conocidos para los expertos en la materia ordinariamente (véase, por ej., Sambrook, et al., 1.989, *supra*).

Una vez que un clon que contiene la secuencia codificadora para la secuencia polipeptídica deseada ha sido preparado o aislado, la secuencia se puede clonar en cualquier vector adecuado, comprendiendo preferiblemente un origen de replicación para mantener la secuencia en una célula huésped.

Vehículos de Suministro de Ácidos Nucleicos

En un aspecto, un vector de ácidos nucleicos que codifica una vacuna quimérica es introducido en una célula. La célula puede ser una célula huésped para replicar el ácido nucleico o para expresar la vacuna quimérica. Preferiblemente, la célula huésped para expresar la vacuna quimérica es una célula presentadora de antígeno (descrita además a continuación).

El vector de ácidos nucleicos comprende mínimamente una secuencia de polinucleótidos para inserción en una célula objetivo y una secuencia de control de la expresión unida de manera operable a la misma para controlar la expresión de la secuencia de polinucleótidos (por ej., transcripción y/o traducción) en la célula. Ejemplos incluyen plásmidos, fagos, secuencias de replicación de manera autónoma (ARS, por sus siglas en inglés), centrómeros y otras secuencias que son capaces de replicarse o ser replicadas *in vitro* o en una célula huésped (por ej., tal como una célula bacteriana, de levadura o de insecto) y/o célula objetivo (por ej., tal como una célula de mamífero, preferiblemente una célula presentadora de antígeno) y/o para llevar las secuencias que codifican la vacuna quimérica a una posición deseada dentro de la célula objetivo.

Los vectores de expresión recombinantes pueden proceder de microorganismos que infecten fácilmente a los animales, incluyendo el ser humano, caballos, vacas, cerdos, llamas, jirafas, perros, gatos o pollos. Los vectores preferidos incluyen aquéllos que ya se han usado como vacunas vivas, tal como vaccinia. Estos recombinantes se pueden inocular directamente en un huésped, confiriendo inmunidad no sólo al vector microbiano, sino también para expresar antígenos extraños. Los vectores preferidos considerados en la presente memoria como vacunas recombinantes vivas incluyen virus de ARN, adenovirus, herpesvirus, virus de la polio y vaccinia y otros poxvirus, como se explica en Flexner, *Adv. Pharmacol.* 21: 51, 1.990, por ejemplo.

Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras para unir ARN polimerasa, secuencias potenciadoras o elementos reguladores negativos para unirse a activadores y represores transcripcionales, respectivamente y/o secuencias de iniciación de la traducción para unión de ribosomas. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano puede incluir un activador tal como el activador lac y para iniciación de la transcripción, la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG (Sambrook, et al., 1.989, *supra*). De manera similar, el vector de expresión eucariota incluye preferiblemente un activador heterólogo, homólogo o quimérico para ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación abajo, el codón de inicio AUG y un codón de terminación para la eliminación de un ribosoma.

Las secuencias de control de la expresión se pueden obtener de genes que se encuentran en la naturaleza o se pueden diseñar. Las secuencias de control de la expresión diseñadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de control de la expresión mutadas y/o quiméricas o secuencias de consenso sintéticas o clonadas. Los vectores que contienen tanto un activador como un sitio de clonación en que se puede ligar de manera operativa un polinucleótido son conocidos en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN in vitro o in vivo y están comercialmente disponibles de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, Calif.) y Promega Biotech (Madison, Wis.).

Para optimizar la expresión y/o transcripción, puede ser necesario retirar, añadir o modificar las porciones no traducidas 5' y/o 3' de los vectores para eliminar codones de iniciación de la traducción extra o alternativos u otras secuencias que pueden interferir con o reducir, la expresión, al nivel de transcripción o traducción. Alternativamente, se pueden insertar sitios de unión de ribosomas de consenso inmediatamente 5' del codón de inicio para aumentar la expresión. Una amplia variedad de secuencias de control de la expresión—secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN ligada de manera operativa a la misma—se puede usar en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los activadores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, poliovirus, adenovirus, herpesvirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de los genes de células de mamíferos y diversas combinaciones de los mismos.

En un aspecto, el vector de suministro de ácidos nucleicos comprende un origen de replicación para replicar el vector. Preferiblemente, el origen funciona en al menos un tipo de célula huésped que se puede usar para generar suficientes números de copias de la secuencia para uso en el suministro a una célula objetivo. Orígenes adecuados por lo tanto incluyen, pero no se limitan a, aquéllos que actúan en células bacterianas (por ej., tal como *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Clostridium sp.*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.* y *Pseudomonas sp.*) levadura (por ej., tal como *Saccharomyces sp.* o *Pichia sp.*), células de insectos y células de mamíferos. En un aspecto preferido, se proporciona un origen de replicación que actúe en la célula objetivo en que se introduce el vehículo de suministro de ácidos nucleicos (por ej., una célula de mamífero, tal como una célula de ser humano). En otro aspecto, se proporcionan al menos dos orígenes de replicación, uno que actúa en una célula huésped y uno que actúa en una célula objetivo.

El vector de suministro de ácidos nucleicos puede comprender, alternativamente, o adicionalmente, secuencias para facilitar la integración de al menos una porción del vector de suministro de ácidos nucleicos en un cromosoma de la célula objetivo. Por ejemplo, el vector de suministro de ácidos nucleicos puede comprender regiones de homología a ADN cromosómico de la célula objetivo. En un aspecto, el vector de suministro comprende dos o más sitios de recombinación que flanquean una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la vacuna quimérica.

El vector puede comprender adicionalmente un marcador detectable y/o seleccionable para verificar que el vector ha sido introducido con éxito en una célula objetivo y/o se puede expresar por la célula objetivo. Estos marcadores pueden codificar una actividad, tal como, pero no limitado a, producción de ARN, péptido o proteína o puede proporcionar un sitio de unión para ARN, péptidos, proteínas, compuestos inorgánicos y orgánicos o composiciones y similares.

Ejemplos de genes marcadores detectables/seleccionables incluyen, pero no se limitan a: segmentos de ADN que codifican productos que proporcionan resistencia contra compuestos de otro modo tóxicos (por ej., antibióticos); segmentos de ADN que codifican productos que están ausentes de otro modo en la célula receptora (por ej., genes ARNt, marcadores auxotróficos); segmentos de ADN que codifican productos que suprimen la actividad de un producto génico; segmentos de ADN que codifican productos que pueden ser fácilmente identificados (por ej., marcadores fenotípicos tales como (β -galactosidasa, una proteína fluorescente (GFP, CFP, YFP, BFP, RFP, EGFP, EYFP, EBFP, dsRed, formas mutadas, modificadas o mejoradas de las mismas y similares) y proteínas de la superficie de la célula); segmentos de ADN que unen productos que de otro modo son perjudiciales para la supervivencia y/o función de las células; segmentos de ADN que inhiben de otro modo la actividad de otros segmentos de ácidos nucleicos (por ej., oligonucleótidos antisentido); segmentos de ADN que unen productos que modifican un sustrato (por ej., endonucleasas de restricción); segmentos de ADN que se pueden usar para aislar o identificar una molécula deseada (por ej., segmentos que codifican sitios de unión de proteínas específicos); secuencias de cebador; segmentos de ADN, que cuando están ausentes, confieren resistencia o sensibilidad directamente o indirectamente a compuestos particulares y/o segmentos de ADN que codifican productos que son tóxicos en células receptoras.

El gen marcador se puede usar como un marcador para conformación de transferencia de genes exitosa y/o para aislar las células que expresan genes transferidos y/o para recuperar genes transferidos desde una célula. Por ejemplo, en un aspecto, el gen marcador se usa para aislar y purificar células presentadoras de antígenos que expresan las vacunas quiméricas.

Como se discutió anteriormente, se pueden usar homólogos, variantes y formas modificadas de cualquiera de las secuencias de dominio siempre que retengan la capacidad para actuar con su función de dominio respectiva. Por ejemplo, una secuencia luminal modificada debe retener la capacidad para transportar materiales antigénicos tanto de membrana como no de membrana a un compartimento endosomal con al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 100% de eficacia comparado con la secuencia de dominio original, es decir, una eficacia que da como resultado suficiente presentación de antígeno por una célula que comprende la secuencia quimérica para que se incremente una respuesta inmunitaria. En un aspecto, las secuencias que contienen una señal de transporte adecuada pueden ser identificadas por construcción de un ADN quimérico que contiene el dominio antigénico bien caracterizado de ovalbúmina, un dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de una proteína que contiene una señal objetivo lisosomal/endosomal putativa. La eficacia del objetivo se puede medir por determinación de la capacidad de las células presentadoras de antígenos, que expresan la proteína quimérica, para estimular las células T restringidas de clase II del MHC, específicas del epítipo HA (véase, por ej., el Ejemplo 5 de la Patente de EE.UU. N° 5.633.234).

Los genes sustancialmente similares pueden ser proporcionados, por ej., genes con más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 70%, más de aproximadamente 90% y preferiblemente, más de aproximadamente 95% de identidad para un gen conocido. Se puede determinar el porcentaje de identidad usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en *Current Protocols In Molecular Biology* (eds., F. M. Ausubel et al., 1.987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferiblemente, los parámetros estándar se usan para alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, usando parámetros estándar. En particular, son programas preferidos BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros estándar: Código genético= estándar; filtro = ninguno; cadena = las dos; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificado por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no superfluas, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones GenBank CDS + SwissProtein + SPupdate + PIR. Se pueden encontrar detalles de estos programas en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

También se pueden proporcionar "variantes modificadas de manera conservadora" de genes. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, variantes modificadas de manera conservadora se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en el caso de que el ácido nucleico no codifique una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codón degenerado por generación de secuencias en que la tercera posición de uno o más codones (o todos) seleccionados está sustituido con residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzner, et al., 1.991, *Nucleic Acid Res.* 19: 5.081; Ohtsuka, et al., 1.985, *J. Biol. Chem.* 260: 2.605-2.608; Rossolini et al., 1.994, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98).

Se pueden identificar inicialmente secuencias de dominio sustancialmente similares por selección de una secuencia que hibrida específicamente una secuencia de dominio de interés en condiciones de hibridación rigurosas. Ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C; concentraciones tampón de hibridación de aproximadamente 6 X SSC a aproximadamente 10 X SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 0% a aproximadamente 25% y disoluciones de lavado de aproximadamente 6 X SSC. Ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C; concentraciones de tampón de aproximadamente 9 X SSC a aproximadamente 2 X SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% y disoluciones de lavado de aproximadamente 5 X SSC a aproximadamente 2 X SSC. Ejemplos de condiciones de alto rigor incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55°C a aproximadamente 68°C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1 X SSC a aproximadamente 0,1 X SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55% a aproximadamente 75% y disoluciones de lavado de aproximadamente 1 X SSC, 0,1 X SSC o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación de hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado y los tiempos de incubación de lavado son aproximadamente 1, 2 ó 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón de citrato 15 mM. Se entiende que se pueden emplear equivalentes de SSC usando otros sistemas tampón. La similitud se puede verificar por secuenciación, pero preferiblemente, es también o alternativamente, verificada por función (por ej., capacidad para transportar un compartimento endosomal y similares), usando ensayos adecuados para el dominio particular en cuestión.

Los ensayos de realización para determinar la idoneidad de secuencias de dominio homólogas, variantes o modificadas es simplemente una cuestión de identificación sistemática para secuencias que expresan la actividad apropiada. Dicha identificación sistemática es rutina en la técnica.

El vector de suministro de ácidos nucleicos puede ser proporcionado como ácidos nucleicos desnudos o en un vehículo de suministro asociado a una o más moléculas para facilitar la entrada de un ácido nucleico en una célula. Los vehículos de suministro adecuados incluyen, pero no se limitan a: formulaciones liposomales, polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos, formulaciones víricas (por ej., incluyendo virus, partículas víricas, envolturas víricas artificiales y similares), vehículos de suministro de células y similares.

Formulaciones a base de lípidos

Los vehículos de suministro diseñados para facilitar el suministro intracelular de moléculas biológicamente activas deben interactuar con entornos tanto no polares como polares (en o sobre, por ejemplo, la membrana plasmática, fluidos de tejido, compartimentos dentro de la célula y similares). Por lo tanto, preferiblemente, se diseñan vehículos de suministro para contener dominios tanto polares como no polares o una secuencia de traslocación para traslocar un ácido nucleico en una célula.

Los compuestos con dominios polares y no polares se denominan anfifilos. Los anfifilos catiónicos presentan grupos polares que son capaces de estar cargados de manera positiva en, o alrededor de, pH fisiológico para interactuar con polinucleótidos cargados de manera negativa tales como ADN.

Los vectores de ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden ser proporcionados en formulaciones que comprenden monocapas o bicapas lipídicas para facilitar la transferencia de los vectores a través de una membrana celular. Se pueden usar liposomas o cualquier forma de membrana lipídica, tal como membranas lipídicas planares o la membrana celular de una célula intacta, por ej., un glóbulo rojo. Se pueden administrar formulaciones liposomales por cualquier medio, incluyendo la administración por vía intravenosa o por vía oral.

Se pueden preparar liposomas y formulaciones liposomales según métodos estándar y son conocidos en la técnica, véase, por ej., Remington's; Akimaru, 1.995, *Cytokines Mol. Ther.* 1: 197-210; Alving, 1.995, *Immunol. Rev.* 145: 5-31; Szoka, 1.980, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467; la Patente de EE.UU. N° 4.235.871; la Patente de EE.UU. N° 4.501.728 y la Patente de EE.UU. N° 4.837.028. En un aspecto, el liposoma comprende una molécula objetivo para fijar como objetivo un complejo de vector de liposoma:ácido nucleico para un tipo de célula particular. En un aspecto preferido en particular, una molécula objetivo comprende una pareja de unión (por ej., un ligando o receptor) para una biomolécula (por ej., un receptor o ligando) en la superficie de un vaso sanguíneo o una célula encontrada en un tejido objetivo.

La carga de liposomas es un determinante importante en la eliminación de liposomas de la sangre, absorbiéndose los liposomas cargados de manera negativa más rápidamente por el sistema reticuloendotelial (Juliano, 1.975, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 651) y así con semividas más cortas en el torrente circulatorio. La incorporación de derivados de fosfatidiletanolamina aumenta el tiempo de circulación evitándose la agregación liposomal. Por ejemplo, la incorporación de N-(omega-carboxi)acilamidofosfatidiletanolaminas en las vesículas unilaminares grandes de L-alfa-diestearoilfosfatidilcolina aumenta espectacularmente el tiempo de vida de la circulación liposomal *in vivo* (véase, por ej., Ahl, 1.997, *Biochim. Biophys. Acta* 1.329: 370-382). Los liposomas con semividas de circulación prolongadas son típicamente deseables para usos terapéuticos y de diagnóstico. Para una discusión general de farmacocinética, véase, por ej., Remington's, Capítulos 37-39, Lee, et al., En *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (Technomic Publishing AG, Basel, Suiza 1.996).

Típicamente, los liposomas se preparan con aproximadamente 5 a 15 por ciento en moles de fosfolípidos cargados de manera negativa, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina o fosfatidil-inositol. Los fosfolípidos cargados de manera negativa añadidos, tales como fosfatidilglicerol, también sirven para evitar la agregación de liposomas espontánea y así minimizar el riesgo de formación de agregados liposomales demasiado pequeños. Los agentes que dan rigidez a la membrana, tales como esfingomielina o un fosfolípido neutro saturado, a una concentración de al menos aproximadamente 50 por ciento en moles y 5 a 15 por ciento en moles de monosialilgangliósido también pueden impartir propiedades de los liposomas de manera deseable, tales como rigidez (véase, por ej., la Patente de EE.UU. N° 4.837.028).

Adicionalmente, la suspensión de liposomas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos frente a daños por radicales libres y peroxidativos de lípidos en el almacenaje. Son preferidos los inhibidores de los radicales libres lipófilos, tales como el alfa-tocoferol y agentes queladores específicos del hierro solubles en agua solubles en agua, tales como ferrioxianina.

Los vehículos de suministro de ácidos nucleicos de la invención pueden incluir vesículas multilaminares de tamaños heterogéneos. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas se pueden disolver en un disolvente o sistema disolvente orgánico adecuado y secarse a vacío o un gas inerte para formar una película de lípidos delgada. Si se desea, la película se puede redissolver en un disolvente adecuado, tal como butanol terciario y liofilizar después para formar una mezcla lipídica más homogénea que está en una forma similar a polvo más fácilmente hidratada. Esta película se cubre con una disolución acuosa del complejo peptídico o polipeptídico y se permite que se hidrate, típicamente durante un periodo de 15 a 60 minutos con agitación. La distribución de tamaños de las vesículas

multilaminares resultantes se puede desplazar hacia tamaños menores por hidratación de los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o por adición de detergentes de solubilización tales como desoxicolato. El medio de hidratación comprende preferiblemente el ácido nucleico en una concentración que se desea en el volumen interior de los liposomas en la suspensión de liposomas final.

Después de la preparación de los liposomas, se pueden dimensionar los liposomas para conseguir un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha de tamaños de los liposomas. Un intervalo de tamaño preferido es aproximadamente 0,2 a 0,4 micrómetros, que permite que la suspensión de liposomas se esterilice por filtración a través de un filtro convencional, típicamente un filtro de 0,22 micrómetros. Se puede llevar a cabo esterilización por filtro sobre una base de alto rendimiento si se han dimensionado los liposomas hasta aproximadamente 0,2 a 0,4 micrómetros. Están disponibles diversas técnicas para dimensionar liposomas a un tamaño deseado (véase, por ej., la Patente de EE.UU. N° 4.737.323).

Los lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, DOTMA (Felgner, et al., 1.987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7.413-7.417), DOGS o Transfectain™ (Behr, et al, 1.989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6.982-6.986), DNERIE o DORIE (Felgner, et al., *Methods* 5: 67-75), DC-CHOL (Gao and Huang, 1.991, *BBRC* 179: 280- 285), DOTAP™ (McLachlan, et al., 1.995, *Gene Therapy* 2: 674-622), Lipofectamine® y compuestos glicerolipídicos (véase, por ej., la patente europea EP 901463 y la patente internacional WO 98/37916).

Otras moléculas adecuadas para complejación con vectores de suministro de ácidos nucleicos incluyen moléculas catiónicas, tales como, poliamidoamina (Haensler and Szoka, 1.993, *Bioconjugate Chem.* 4: 372-379), polisina dendrítica (patente internacional WO 95/24221), polietilenirina o polipropilén-h-nina (patente internacional WO 96/02655), polilisina (Patente de EE.UU. N° 5.595.897; patente francesa FR 2 719 316), quitosán (Patente de EE.UU. N° 5.744.166), coarcevatos de gelatina con ADN (véase, por ej., la Patente de EE.UU. N° 6.207.195; la Patente de EE.UU. N° 6.025.337; la Patente de EE.UU. N° 5.972.707) o DEAE dextrano (Lopata, et al., 1.984, *Nucleic Acid Res.* 12: 5.707-5.717).

Vehículos de Suministro de Genes con Base Vírica

En un aspecto, el vehículo de suministro de ácidos nucleicos comprende un virus o partícula vírica. En este aspecto, preferiblemente, el vector de ácidos nucleicos comprende un vector vírico. Los vectores víricos, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus, con frecuencia están constituidos por dos componentes, un genoma vírico modificado y una estructura de cubierta que lo rodea (véase, por ej., Smith et al., 1.995, *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 807-838), aunque a veces se introducen vectores víricos en forma desnuda o recubiertos con proteínas distintas de proteínas víricas. La mayoría de los vectores actuales tienen estructuras de recubrimiento similares a un virus natural. Esta estructura empaqueta y protege el ácido nucleico vírico y proporciona los medios para unir y entrar en células objetivo.

Preferiblemente, los vectores víricos se modifican a partir de genomas víricos naturales para inhabilitar el crecimiento del virus en una célula objetivo mientras que se permite que el virus crezca en una célula huésped (por ej., tal como una célula de empaquetamiento o auxiliar) usados para preparar partículas infecciosas. Los ácidos nucleicos de los vectores generalmente secuencias víricas que actúan en cis esenciales para replicación y empaquetamiento en una estirpe auxiliar y secuencias de control de la expresión para la regulación de la expresión de un polinucleótido que se está suministrando a una célula objetivo. Otras funciones víricas se expresan en trans en estirpes celulares de empaquetamiento o auxiliares específicas como se conoce en la técnica.

Los vectores preferidos son vectores víricos procedentes de un virus seleccionado del grupo que consiste en: herpesvirus, citomegalovirus, virus espumosos, lentivirus, virus del bosque de Semliki, AAV (virus adeno-asociado), poxvirus, adenovirus y retrovirus. Dichos vectores víricos son conocidos en la técnica.

En un aspecto preferido, un vector vírico usado es un vector adenovírico. El genoma adenovírico consiste en una molécula de ADN de doble cadena lineal de aproximadamente 36 kb que soporta más de aproximadamente treinta genes necesarios para completar el ciclo de replicación vírica. Los genes tempranos se dividen en 4 regiones (E1 a E4) que son esenciales para la replicación vírica con la excepción de la región E3, que se cree que modula la respuesta inmunitaria del huésped antivírica. La región E1 (E1A y E1B) codifica las proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico. La expresión de los genes de la región E2 (E2A y E2B) conduce a la síntesis de los polipéptidos necesarios para la replicación vírica. Las proteínas codificadas por la región E3 evitan la citólisis mediante células T citotóxicas y factor de necrosis tumoral (Wold and Gooding, 1.991, *Virology* 184: 1-8). Las proteínas codificadas por la región E4 están implicadas en la replicación del ADN, expresión tardía de los genes y proceso de corte y empalme y corte de las células huésped (Halbert, et al., 1.985, *J. Virol.* 56: 250-257). Los genes tardíos codifican en general las proteínas estructurales que contribuyen a la cápside vírica. Además, el genoma adenovírico lleva a las ITR 5' y 3' que actúan en cis (Repetición Terminal Invertida, por sus siglas en inglés) y secuencias de empaquetamiento esenciales para la replicación del ADN. El puerto de la ITR origina la replicación del ADN al tiempo que se requiere la región de encapsidación para el empaquetamiento de ADN adenovírico en partículas infecciosas.

Los vectores adenovíricos se pueden lograr para que sean de replicación condicionada (vectores CRAd) para replicarse de manera selectiva en células específicas (por ej., tales como células proliferativas) como se describe en Heise and Kim (2.000, *J. Clin. Invest.* 105: 847- 85 1). En otro aspecto, un vector adenovírico es de replicación defectuosa para la función E1 (por ej., por delección total o parcial o mutagénesis de E1). La cadena principal adenovírica del vector puede comprender modificaciones adicionales (delecciones, inserciones o mutaciones en uno o más genes víricos). Un ejemplo de una modificación E2 se ilustra por la mutación termosensible localizada en el gen que codifica la DBP (Proteína de Unión a ADN) (Ensinger et al., 1.972, *J. Virol.* 10: 328- 339). La secuencia adenovírica también se puede eliminar de toda o de parte de la región E4 (véase, por ej., la patente europea EP 974 668; Christ, et al., 2.000, *Human Gene Ther.* 11: 415-427; Lusky, et al., 1.999, *J. Virol.* 73: 8.308-8.319). Delecciones adicionales dentro de la región E3 no esencial puede permitir el dimensionamiento del polinucleótido que se está suministrando para que aumente (Yeh, et al., 1.997, *FASEB Journal* 11: 615 623). Sin embargo, puede ser ventajoso retener todo o parte de las secuencias E3 que codifican los polipéptidos (por ej., tal como gp19k) permitiendo que el virus escape al sistema inmunitario (Gooding, et al., 1.990, *Critical Review of Immunology* 10: 53-71) o reacciones inflamatorias (patente europea EP 00440267.3).

Los vectores de segunda generación que retienen las ITR y las secuencias de empaquetamiento y que comprenden modificaciones genéticas sustanciales para suprimir la síntesis residual de los antígenos víricos también se pueden usar para mejorar la expresión a largo plazo del gen expresado en las células transducidas (véase, por ej., la patente internacional WO 94/28152; Lusky, et al., 1.998, *J. Virol* 72: 2.022-2.032).

El polinucleótido que se introduce en la célula se puede insertar en cualquier posición del genoma vírico, con la excepción de las secuencias que actúan en cis. Preferiblemente, se inserta en sustitución de una región suprimida (E1, E3 y/o E4), preferiblemente, dentro de una región E1 suprimida.

Los adenovirus pueden proceder de cualquier fuente humana o animal, en particular fuentes: canina (por ej., CAV-1 o CAV-2 Genbank ref. CAVIGENOM y CAV77082, respectivamente), aviar (Genbank ref. AAVEDSDNA), bovina (tal como BAV3; Reddy, et al., 1.998, *J. Virol.* 72: 1.394 1.402), murina (Genbank ref. ADRMUSMAVI), ovina, felina, porcina o simia o alternativamente, pueden ser un virus híbrido. Se puede emplear cualquier serotipo. Sin embargo, se prefieren los adenovirus humanos del sub-grupo C, especialmente adenovirus 2 (Ad2) y 5 (Ad5). Dichos virus están disponibles, por ejemplo, a partir del ATCC.

También se pueden usar partículas adenovíricas o cápsides adenovíricas vacías para transferir vectores de suministro de ácidos nucleicos mediante un procedimiento de cointernalización mediado por virus como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.928.944. Este procedimiento se puede llevar a cabo en presencia de agente o agentes catiónicos tales como policarbenos o vesículas lipídicas que comprenden una o más capas lipídicas.

Se pueden preparar y propagar partículas adenovíricas según cualquier técnica convencional en el campo de la técnica (por ej., la patente internacional WO 96/17070) usando una estirpe celular de complementación o un virus auxiliar, que suministra en trans los genes víricos ausentes para replicación vírica. Las estirpes celulares 293 (Graham et al., 1.977, *J. Gen. Virol.* 36: 59-72) y PERC6 (Fallaux et al., 1.998, *Human Gene Therapy* 9: 1.909-1.917) se usan comúnmente para delecciones del complemento E1. Otras estirpes celulares se han logrado para complementar vectores anormales (Yeh, et al., 1.996, *J. Virol.* 70: 559-565; Kroughak and Graham, 1.995, *Human Gene Ther.* 6: 1.575-1.586; Wang, et al., 1.995, *Gene Ther.* 2: 775-783; Lusky, et al., 1.998, *J. Virol* 72: 2.022-203; la patente europea EP 919627 y la patente internacional WO 97/04119). Las partículas adenovíricas se pueden recuperar del sobrenadante del cultivo pero también de las células después de lisis y opcionalmente purificar adicionalmente según técnicas estándar (por ej., cromatografía, ultracentrifugación, como se describe en las patentes internacionales WO 96/27677, WO 98/00524, WO 98/26048 y WO 00/50573).

Se puede conseguir un objetivo específico del tipo de célula con vectores procedentes de adenovirus con un amplio intervalo de huéspedes por la modificación de proteínas de superficie vírica. Por ejemplo, la especificidad de la infección de adenovirus se determina por la unión a receptores celulares presentes en la superficie de células admisibles. Con respecto a esto, la fibra y pentón presentes en la superficie de la cápside del adenovirus desempeñan un papel crítico en la unión celular (Defer, et al., 1.990, *J. Virol.* 64: 3.661-3.673). Así, la fijación como objetivo de la célula de los adenovirus se puede realizar por modificación genética del gen vírico que codifica la fibra o pentón, para generar fibra y/o pentón modificados capaces de interacción específica con receptores únicos de superficie celular. Ejemplos de dichas modificaciones se describen en Wickam, et al., 1.997, *J. Virol.* 71: 8.221-8.229; Arriberg, et al., 1.997, *Virol. Chem* 268: 6.866-6.869; Roux, et al., 1.989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9.079-9.083; Miller y Vile, 1.995, *FASEB J.* 9: 190-199; la patente internacional WO 93/09221 y en la patente internacional WO 95/28494.

En un aspecto preferido en particular, se usan secuencias víricas adeno-asociadas como vectores. Los vectores procedentes de AAV-2 de parvovirus humano (virus adeno-asociados tipo 2) están entre la mayoría de los vehículos de suministro de genes prometedores que se está desarrollando en la actualidad. Algunas de las características de este sistema para empaquetamiento de un ADN monocatenario lo sugiere como una posible alternativa a ADN

desnudo para suministro de vacunas genéticas. Una característica atractiva principal, en contraste con otros vectores víricos tales como vaccinia o adenovirus, es que los vectores AAV no expresan cualquier gen vírico. Las únicas secuencias de ADN vírico incluidas en la construcción de la vacuna son las repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pb. Así, como en la inmunización con ADN desnudo, el único gen expresado es el del antígeno o quimera del antígeno. Adicionalmente, los vectores AAV son conocidos para transducir células tanto de división como de no división, tales como células dendríticas procedentes de monocitos sanguíneos periféricos humanos, con expresión de transgenes persistente y con la posibilidad de suministro oral e intranasal para la generación de inmunidad mucosal. Por otra parte, la cantidad de ADN requerida parece que es mucho menos por varios órdenes de magnitud, con respuestas máximas a dosis de 10^{10} a 10^{11} partículas o copias de ADN por el contrario a dosis de ADN desnudo de 50 μg o $\sim 10^{15}$ copias.

En un aspecto, los vectores AAV se empaquetan por co-transinfección de una estirpe celular adecuada (por ej., células 293 humanas) con el ADN contenido en las construcciones que codifican las proteínas quiméricas ITR AAV y un plásmido auxiliar AAV ACG2 que contiene la región codificadora de AAV (genes rep y cap AAV) sin las ITR. Las células se infectan con posterioridad con el adenovirus Ad5. Los vectores se pueden purificar a partir de lisados celulares usando métodos conocidos en la técnica (por ej., tal como ultracentrifugación por gradiente de densidad de cloruro de cesio) y son validados para asegurar que estén exentos de replicación detectable – AAV competente o adenovirus (por ej., por un bioensayo de efecto citopático). Se puede determinar el título AAV por PCR cuantitativa con muestras de ADN de virus preparadas después de digestión con proteinasa K. Preferiblemente, los títulos de los vectores producidos por dicho método son aproximadamente 5×10^{12} a 1×10^{13} partículas resistentes a DNasa por ml.

En otros aspectos, se usan vectores retrovíricos. Los retrovirus son una clase de virus integrantes que se replican usando una transcriptasa inversa codificada por virus, para replicar el genoma de ARN vírico en ADN bicatenario que se integra en ADN cromosómico de las células infectadas (por ej., células objetivo). Dichos vectores incluyen los procedentes de virus de leucemia murina, especialmente Moloney (Gilboa, et al., 1.988, *Adv. Exp. Med. Biol.* 241: 29) o cepas FB29 de Friend (patente internacional WO 95/01447). En general, se elimina un vector retrovírico de todo o de parte de los genes víricos gag, pol y env y retiene las LTR 5' y 3' y una secuencia de encapsidación. Estos elementos se pueden modificar para aumentar el nivel de expresión o la estabilidad del vector retrovírico. Dichas modificaciones incluyen la sustitución de la secuencia de encapsidación retrovírica por uno de un retrotransposón tal como VL30 (véase, por ej., la Patente de EE.UU. Nº 5.747.323). Preferiblemente, el polinucleótido de interés es insertado debajo de la secuencia de encapsidación, preferiblemente en dirección opuesta relativa al genoma retrovírico. Se puede conseguir un objetivo específico de la célula por la conjugación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a la proteína de envuelta retrovírica como se conoce en la técnica.

Las partículas retrovíricas se preparan en presencia de un virus auxiliar o en una estirpe celular de complementación (empaquetamiento) apropiada que contiene integrado en su genoma los genes retrovíricos para los que el vector retrovírico es anormal (por ej., gag/pol y env). Dichas estirpes celulares se describen en la técnica anterior (Miller y Rosman, 1.989, *BioTechniques* 7: 980; Danos y Mulligan, 1.988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6.460; Markowitz, et al., 1.988, *Virol.* 167: 400). El producto del gen env es responsable de la unión de la partícula vírica a los receptores víricos presentes en la superficie de la célula objetivo y determina por lo tanto el intervalo del huésped de la partícula retrovírica en el contexto de la invención, es ventajoso para usar una estirpe celular de empaquetamiento, tal como las células PA317 (ATCC CRL 9078) o 293E16 (patente internacional WO 97/35996) que contienen una proteína de envoltura anfotrópica, para permitir la infección de células objetivo de seres humanos y de otras especies. Las partículas retrovíricas se recuperan preferiblemente del sobrenadante del cultivo y pueden ser opcionalmente purificadas además según técnicas estándar (por ej., cromatografía, ultracentrifugación).

Otros virus adecuados incluyen poxvirus. Se ha cartografiado y secuenciado el genoma de diversos miembros de poxviridae. Se puede obtener un vector poxvírico de cualquier miembro de poxviridae, en particular virus canaripox, fowlpox y vaccinia. Los virus vaccinia adecuados incluyen, pero no se limitan a, la cepa Copenhagen (Goebel, et al., 1.990, *Virol.* 179: 247-266; Johnson, et al., 1.993, *Virol.* 196: 381-401), la cepa Wyeth y la cepa Ankara modificada (MVA) (Antoine, et al, 1.998, *Virol.* 244: 365-396). Las condiciones generales para la construcción de un vector del virus vaccinia son conocidas en la técnica (véanse, por ej., las patentes europeas EP 83 286 y EP 206 920; Mayr et al., 1.975, *Infection* 3: 6-14; Sutter y Moss, 1.992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10.847-10.851). Preferiblemente, el polinucleótido de interés es insertado dentro de un lugar no esencial tal como las regiones intergénicas que codifican nOD7 o cualquier gen para el que la inactivación o eliminación no debilitan significativamente el crecimiento y la replicación víricas.

Se preparan partículas poxvíricas como se describe en la técnica (Piccini, et al., 1.987, *Methods of Enzymology* 153: 545-563; la Patente de EE.UU. Nº 4.769.330; la Patente de EE.UU. Nº 4.772.848; la Patente de EE.UU. Nº 4.603.112; la Patente de EE.UU. Nº 5.100.587 y la Patente de EE.UU. Nº 5.179.993). En general, se construye un plásmido donador, se multiplica por crecimiento en *E. coli* y se aísla por procedimientos convencionales. Después, se introduce en un cultivo celular adecuado (por ej., fibroblastos de embrión de pollo) junto con un genoma poxvirus, para producir, por recombinación homóloga, partículas poxvíricas. Estas se pueden recuperar del sobrenadante del cultivo o a partir de las células cultivadas después de la etapa de lisis (por ej., lisis química,

congelación/descongelación, choque osmótico, exposición a ultrasonidos y similares). Se pueden usar series consecutivas de purificación en placa para retirar virus naturales contaminantes. Las partículas víricas se pueden purificar después usando las técnicas conocidas en la técnica (por ej., métodos cromatográficos o ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio o sacarosa).

El uso de vaccinia como una vacuna de virus vivos en la campaña global para erradicar viruela hizo vaccinia una elección obvia para el desarrollo como un vector vacuna recombinante vivo. Se han indicado los virus vaccinia recombinantes vivos que expresan cerca de 100 proteínas extrañas diferentes y un número de éstos son vacunas experimentales eficaces (revisado por Moss y Flexner, 1.987). Vaccinia es en particular versátil como un vector de expresión debido a su tamaño genómico grande, capacidad para aceptar al menos 25.000 pares de bases de ADN extraño y su capacidad para infectar la mayoría de los tipos de células eucariotas, incluyendo células de insecto (en el mismo). A diferencia de otros virus de ADN, los poxvirus se replican exclusivamente en el citoplasma de células infectadas, reduciendo la posibilidad de intercambio genético de ADN vírico recombinante con el cromosoma del huésped. Los vectores de vaccinia recombinante se han mostrado para tratar y expresar apropiadamente las proteínas a partir de una variedad de fuentes incluyendo el hombre, otros mamíferos, parásitos, virus de ARN y ADN, bacterias y bacteriófago.

El virus es capaz de infectar a la mayoría de los mamíferos, haciéndolo un vector útil para estudiar un amplio intervalo de enfermedades de seres humanos y animales. La expresión de ADN codificador de una proteína extraña es controlada por elementos reguladores de virus de huésped, incluyendo secuencias de activador arriba y, en el caso de que sea necesario, señales de tratamiento de ARN. La inserción de ADN extraño en regiones no esenciales del genoma del virus vaccinia se ha llevado a cabo por recombinación homóloga (Panicali, et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 79: 4.927, 1.982; Mackett, et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 79: 7.415, 1.982).

La expresión de genes extraños dentro del ADN puede tener lugar debido a elementos reguladores transcripcionales en o cerca del sitio de inserción o por ingeniería genética más precisa. Se han construido vectores de plásmidos que facilitan enormemente la inserción y expresión de genes extraños (Mackett, et al., *J. Virol*, 49: 857, 1.982). Estos vectores contienen un sitio de expresión, constan de un activador transcripcional de vaccinia y uno o más sitios de endonucleasas de restricción únicos para inserción de la secuencia de codificación extraña flanqueada por ADN a partir de una región no esencial del genoma de vaccinia. La elección de activador determina tanto el tiempo (por ej., temprano o tardío) como el nivel de expresión, mientras que la secuencia de ADN de flanco determina el sitio de recombinación homóloga.

Sólo aproximadamente una en partículas de un ciento de partículas víricas producidas por este procedimiento es recombinante. Aunque se pueden identificar placas de virus recombinantes por hibridación de ADN, se han desarrollado procedimientos de selección eficaces. Por el uso de segmentos de gen timidina cinasa (TC) del virus vaccinia no esencial como secuencias de flanqueamiento, el gen extraño se recombina en el lugar TC y por inserción inactiva el gen TC. La selección de virus TC se consigue realizando el ensayo de placa de virus en células TC en los presentes de 5-bromodesoxiuridina. La fosforilación del análogo de nucleósido e incorporación letal posterior en ADN vírico tiene lugar sólo en células infectadas con virus parenteral TC. Dependiendo de la eficacia de la transfección y recombinación, se desean hasta 80 de las placas recombinantes y el resto son mutantes de TC espontáneos.

Los vectores de los plásmidos que contienen el gen β -galactosidasa de *E. coli*, así como un sitio de expresión para un segundo gen, permite un método alternativo para distinguir recombinante de virus parenteral (Chakrabarti, et al., *Mol. Cell. Biol*, 5: 3.403, 1.985). Las placas formadas por dichos recombinantes se pueden identificar de manera positiva por el color azul que se forma en la adición de un indicador apropiado. Por combinación de tanto selección TC como expresión de la beta-galactosidasa, se aísla fácilmente y rápidamente virus recombinante. Los recombinantes se multiplican después por propagación en estirpes celulares adecuadas y la expresión del gen insertado se comprueba por procedimientos enzimológico, inmunológico o físico apropiados.

Un límite superior a la cantidad de información genética que se puede añadir al genoma del virus vaccinia aún no se conoce. Sin embargo, la adición de casi 25.000 pares de bases de ADN extraño no presentaba efecto perjudicial aparente sobre el rendimiento de virus (Smith, et al., *Gene*, 25: 21, 1.983). En el caso de que sea necesario, segmentos grandes del genoma del virus vaccinia se podían eliminar para proporcionar capacidad adicional (Moss, et al., *J. Virol*, 40: 387, 1.981).

Las moléculas de cápsides víricas pueden incluir restos objetivo para facilitar la fijación como objetivo y/o la entrada a las células. Las moléculas objetivo adecuadas, incluyen, pero no se limitan a: conjugados químicos, lípidos, glicolípidos, hormonas, azúcares, polímeros (por ej., PEG, polilisina, PEI y similares), péptidos, polipéptidos (véase, por ej., la patente internacional WO 94/40958), vitaminas, antígenos, lectinas, anticuerpos y fragmentos de los mismos. Preferiblemente, dichas moléculas objetivo reconocen y se unen a marcadores específicos de la célula, marcadores específicos de tejidos, receptores celulares, antígenos víricos, epítomos antigénicos o marcadores asociados al tumor.

Una composición basada en partículas víricas se puede formular en la forma de dosis de entre 10 y 10^{14} u. i. (unidades infecciosas) y preferiblemente, entre 10 y 10^{11} u. i. El título se puede determinar por técnicas convencionales. Las dosis de vector de suministro de ácidos nucleicos están comprendidas preferiblemente entre 0,01 y 10 mg/kg, más especialmente entre 0,1 y 2 mg/kg.

Vehículos de suministro a base de células

Los vectores de ácidos nucleicos según la invención se pueden suministrar a células objetivo por medio de otras células ("células de suministro") que comprenden los vectores. Los métodos para introducir vectores en células son conocidos en la técnica e incluyen la microinyección de ADN en el núcleo de una célula (Capechi, et al., 1.980, *Cell* 22: 479-488); transfección con CaPO_4 (Chen y Okayama, 1.987, *Mol. Cell Biol.* 7: 2.745-2.752), electroporación (Chu, et al., 1.987, *Nucleic Acid Res.* 15: 1.311-1.326); fusión de lipofección/liposomas (Felgner, et al., 1.987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7.413-7.417) y bombardeo de partículas (Yang, et al., 1.990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9.568-9.572). Las células adecuadas incluyen células autólogas y no autólogas y pueden incluir células xenogénicas. Se pueden inducir células de suministro para suministrar sus contenidos a las células objetivo por inducción de su muerte (por ej., proporcionando genes suicidas a estas células).

Moléculas accesorias

Las composiciones según la invención pueden comprender una o más moléculas accesorias para facilitar la introducción de un vector de suministro de ácidos nucleicos en una célula y/o para aumentar un efecto terapéutico particular.

Además, la composición según la presente invención puede incluir una o más sustancias estabilizantes, tales como lípidos, inhibidores de las nucleasas, hidrogeles, hialuronidasa (patente internacional WO 98/53853), colagenasa, polímeros, agentes quelantes (patente europea EP 890362), para inhibir la degradación dentro del cuerpo de un animal/ser humano y/o aumentar la transfección/infección del vector en una célula objetivo. Dichas sustancias se pueden usar solas o en asociación (por ej., lípidos catiónicos y neutros).

También se ha demostrado que las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar los endosomas y aumentar la absorción de ADN en las células. La mezcla de adenovirus para disoluciones que contienen un vector de ADN complejado con lípidos o la unión de ADN a polilisina unida de manera covalente a adenovirus usando agentes de reticulación de proteínas puede aumentar sustancialmente la absorción y expresión de un vector de suministro de ácidos nucleicos (véase, por ej., Curiel, et al., 1.992, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6: 247-252).

Células huésped

Se pueden expresar vectores de ácidos nucleicos según la invención en una variedad de células huésped, incluyendo, pero no limitándose a: células procariotas (por ej., *E. coli*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*); células de levadura (por ej., *Saccharomyces sp.*); células de insecto; células de nemátodo; células de plantas; células de anfibio (por ej., *Xenopus*); células aviares y células de mamífero (por ej., células humanas, células de ratón, estirpes celulares de mamífero, células de mamífero cultivadas principales, tales como de tejidos diseccionados).

Las moléculas se pueden expresar en células huésped aisladas de un organismo, células huésped que son parte de un organismo, o células huésped que se introducen en un organismo. En un aspecto, se expresan moléculas de fusión en células huésped *in vitro*, por ej., en cultivo. En otro aspecto, se expresan moléculas de fusión en un organismo transgénico (por ej., un ratón, rata, conejo, cerdo, primate, etc. transgénico) que comprenden células somáticas y/o de línea germinal que comprenden ácidos nucleicos que codifican las moléculas de fusión. Los métodos para la construcción de animales transgénicos son conocidos en la técnica y son rutina.

También se pueden introducir vectores de ácidos nucleicos en células *in vitro* y las células (por ej., tales como células de tallo, células hematopoyéticas, linfocitos y similares) se pueden introducir en el organismo del huésped. Las células pueden ser heterólogas o autólogas con respecto al organismo del huésped. Por ejemplo, las células se pueden obtener de los vectores de ácido nucleico del organismo del huésped, introducidos en las células *in vitro* y reintroducidos después en el organismo del huésped.

Células presentadoras de antígenos

En un aspecto preferido de la invención, un vehículo de suministro de ácidos nucleicos tal como se describió anteriormente es introducido en una célula presentadora de antígeno natural o lograda por ingeniería.

El término "célula presentadora del antígeno" (APC) como se usa en la presente memoria se destina a cualquier célula que presenta en su superficie un antígeno junto con una molécula de complejo de histocompatibilidad principal, preferiblemente una molécula de clase II o porción de la misma. Se discuten ejemplos de APC adecuadas con detalle a continuación e incluyen, pero no se limitan a, células completas tales como macrófagos, células

dendríticas, células B, APC híbridas y células de acogida presentadoras de antígenos. Se describen métodos para preparar APC híbridas y son conocidos en la técnica.

Las células dendríticas (CD) son potentes células presentadoras de antígeno. Se ha demostrado que las CD proporcionan todas las señales requeridas para la activación y proliferación de células T. Estas señales se pueden categorizar en dos tipos. El primer tipo, que proporciona especificidad a la respuesta inmunitaria, está mediado por interacción entre el complejo de receptor de células T/CD3 ("TCR/CD3") y un péptido antigénico presentado por una proteína de clase I o II de complejo de histocompatibilidad principal ("MHC" definido anteriormente) en la superficie de las APC. Esta interacción es necesaria, pero no es suficiente, para que tenga lugar activación de células T. De hecho, sin el segundo tipo de señales, el primer tipo de señales puede dar como resultado anergia de células T. El segundo tipo de señales, denominadas señales co-estimuladoras, ni es específico de antígeno ni está restringido a MHC y puede conducir a una respuesta de proliferación completa de las células T e inducción de funciones efectoras de las células T en presencia del primer tipo de señales.

Se ha demostrado que diversas moléculas aumentan la actividad co-estimuladora. Estas incluyen, pero no se limitan a, antígeno estable al calor (HSA, por sus siglas en inglés), cadena invariante de MHC modificada por sulfato de condroitina (li-CS), molécula I de adhesión intracelular (ICAM- 1) y molécula co-estimuladora B7 en la superficie de las APC y su contra- receptor CD28 o CTLA-4 en las células T.

Otras moléculas co-estimuladoras importantes son CD40, CD54, CD80, CD86. Como se usa en la presente memoria, el término "molécula co-estimuladora" incluye cualquier molécula sola o asociación de moléculas que, cuando actúan junto con un complejo de péptido/MHC unido por un TCR en la superficie de una célula T, proporciona un efecto co-estimulador que consigue la activación de la célula T que une el péptido. El término así incluye B7, u otra u otras moléculas co-estimuladoras sobre una APC, fragmentos de las mismas (solas, complejadas con otra u otras moléculas o como parte de una proteína de fusión) que, junto con complejo de péptido/MHC, se une a un ligando de origen similar y da como resultado la activación de la célula T cuando la TCR en la superficie de la célula T se une específicamente al péptido. Las moléculas co-estimuladoras están comercialmente disponibles de una variedad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, Beckman Coulter.

En un aspecto de la invención, el método descrito en Romani et al., *J. Immunol. Methods* 196: 135-151, 1.996 y Bender et al, *J. Immunol. Methods* 196: 121-135, 1.996, se usan para generar células dendríticas inmaduras y maduras a partir de las células monocelulares sanguíneas periféricas (las PBMC, por sus siglas en inglés) de un mamífero, tal como una murina, simio o ser humano. En pocas palabras, las PBMC aisladas son tratadas previamente para disminuir las células T y B por medio de una técnica inmunomagnética. La PBMC reducida de linfocitos se cultiva después en medio RPMI (por ej., aproximadamente 7 días), enriquecido con plasma humano (preferiblemente plasma autólogo) y GM-CSF/IL-4, para generar células dendríticas. Las células dendríticas no son adherentes cuando se compara con sus progenitores de monocitos. Así, el día 7 aproximadamente, se recogieron células no adherentes para tratamiento adicional.

Las células dendríticas procedentes de PBMC en presencia de GM-CSF e IL-4 son inmaduras, porque pueden perder la propiedad de no adherencia y retornan al destino de célula macrófago en los estímulos de citocinas si se eliminan del cultivo. Las células dendríticas en un estado inmaduro son muy eficaces en el tratamiento de antígenos de proteínas naturales para la ruta restringida de la clase II del MHC (Romani, et al., *J. Exp. Med.* 169: 1.169,1.989). Se realiza maduración adicional de células dendríticas cultivadas por el cultivo durante 3 días en un medio acondicionado de macrófagos (CM), que contiene los factores de maduración necesarios. Las células dendríticas maduras son menos capaces de capturar nuevas proteínas para la presentación pero son mucho mejores en la estimulación del reposo de las células T (tanto CD4 como CD8) para crecer y diferenciarse.

Se pueden identificar células dendríticas maduras por su cambio en morfología, tal como la formación de procedimientos citoplasmáticos más móviles; por su no adherencia; por la presencia de al menos uno de los siguientes marcadores: CD83, CD68, HLA-DR o CD86 o por la pérdida de receptores Fc tales como CD 115 (revisado en Steinman, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271, 1.991). Las células dendríticas maduras se pueden recoger y analizar usando citofluorografía típica y técnicas de clasificación de células y dispositivos, tales como FACScan y FACStar. Los anticuerpos primarios usados para citometría de flujo son los específicos para antígenos de la superficie celular de células dendríticas maduras y están comercialmente disponibles. Los anticuerpos secundarios se pueden biotinar Igs seguido por estreptavidina conjugada a FITC o PE.

Alternativamente, otros han indicado eso un método para regular hacia arriba (activar) células dendríticas y convertir monocitos en un fenotipo de células dendríticas activadas. Este método implica la adición de ionóforo de calcio al medio de cultivo los monocitos se convierten en células dendríticas activadas. La adición del ionóforo A23187 de calcio 21, por ejemplo, al comienzo de un periodo de cultivo de 24-48 horas dio como resultado la activación uniforme y la conversión fenotípica de células dendríticas de las fracciones de "monocito más DC" mezcladas: de manera característica, la población activada llega a ser uniformemente CD14 (Leu M3) negativo y regula hacia arriba HLA-DR, HLA- DQ, ICAM-1.137,1 y 137,2. Además, esta población volumétrica activada actúa también sobre una base de números bajos como purificado adicional. La combinación o combinaciones específicas de citocinas se han

usado con éxito para multiplicar (o sustituir parcialmente) para la activación/conversión conseguida con ionóforo de calcio: estas citocinas incluyen, pero no se limitan a, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-4. Cada citocina cuando se proporciona sola es inadecuada para la regulación óptima hacia arriba.

La segunda propuesta para aislar las APC es recoger los números relativamente grandes de las APC precomprometidas circulando ya en la sangre. Las técnicas previas para aislar las APC comprometidas de sangre periférica humana han implicado combinaciones de procedimientos físicos tales como gradientes de metrizamida y etapas de adherencia/no adherencia (Freudenthal et al. *PNAS* 87: 7.698- 7.702, 1.990); separaciones por gradiente Percoll (Mehta-Damani, et al., *J. Immunol.* 153: 996- 1.003, 1.994) y técnicas de clasificación de células activadas por fluorescencia (Thomas et al., *J. Immunol.* 151: 6.840-52, 1.993).

Debería ser obvio para los expertos en la materia que hay muchos métodos rutinarios en la técnica para aislar células presentadoras de antígenos profesionales (o sus precursores) y que dichos métodos y otros que se pueden desarrollar no son limitantes y están incluidos dentro del alcance de la invención.

En una realización, las APC y por lo tanto las células que presentan uno o más antígenos son autólogas. En otra realización, las APC que presentan el antígeno son alogénicas, es decir, procedentes de un individuo diferente.

Como se discutió anteriormente, los ácidos nucleicos que codifican moléculas quiméricas se pueden introducir en las APC usando los métodos descritos anteriormente u otros conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, transfección, electroporación, fusión, microinyección, suministro con base vírica o suministro a base de células. Arthur et al., *Cancer Gene Therapy* 4(1): 17-25, 1.997, indican una comparación de métodos de transferencia de genes en células dendríticas humanas.

Se publica el antígeno de leucocito humano conocido, parcial y putativo (HLA, por sus siglas en inglés), la designación genética para las secuencias de aminoácidos y nucleótidos, del MHC humano, incluyendo la secuencia de consenso (véase, por ej., Zemmour y Parham, *Immunogenetics* 33: 310-320, 1.991) y son conocidas estirpes celulares que expresan variantes de HLA y en general están disponibles también, muchas de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC, por sus siglas en inglés"). Por lo tanto, usar secuencias de nucleótidos que codifican la clase II del MHC, PCR, está ligado de manera operativa fácilmente a un vector de expresión de esta invención que se usa después para transformar una célula apropiada para expresión en la misma.

Se pueden usar las APC profesionales, tales como macrófagos, células B, monocitos, células dendríticas y células de Langerhans. Éstas se recogen de la sangre o tejido de: 1) un donador autólogo; 2) un donador heterólogo con una especificidad de HLA diferente después de que se trate el huésped o 3) de un donador xenogénico de una especie diferente usando procedimientos estándar (Coligan, et. al., *Current Protocols in Immunology*, secciones 3 y 14, 1.994). Las células pueden ser aisladas de un huésped normal o un paciente con una enfermedad infecciosa, cáncer, enfermedad autoinmunitaria o alergia.

Las APC profesionales se pueden obtener de la sangre periférica usando leucoferesis y centrifugación por gradiente de densidad "FICOLL/HYPAQUE" (centrifugación paso a paso a través de Ficoll y gradientes discontinuos de densidad Percoll). Se utilizan procedimientos que evitan la exposición de las APC a antígenos que se podían internalizar por las APC, conduciendo a la activación de células T no específicas para los antígenos de interés.

Se puede lograr que las células que no son presentadoras de antígenos de manera natural sean presentadoras de antígenos mediante la introducción de secuencias que codifiquen las moléculas apropiadas. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican moléculas de clase II del MHC, moléculas accesorias, moléculas co-estimuladoras y moléculas que ayudan en el tratamiento de los antígenos se pueden introducir después de síntesis directa, clonación, purificación de ADN de células que contienen dichos genes y similares. Un medio de expediente para obtener genes para codificar las moléculas usadas en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es por multiplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en patrones de ácidos nucleicos seleccionados con parejas de cebadores de oligonucleótidos seleccionadas. Por ejemplo, se pueden usar células epiteliales, células endoteliales, células tumorales, fibroblastos, células T activadas, eosinófilos, queratinocitos, astrocitos, células microgliales, células epiteliales corticales tímica, células de Schwann, células epiteliales de pigmento retinal, mioblastos, células de músculos lisos vasculares, condrocitos, enterocitos, tirocitos y células del túbulo renal. Estas pueden ser células primarias recién explantadas de un huésped y sin muchos pases en cultivo celular para formar una estirpe celular establecida o estirpes celulares establecidas que son relativamente homogéneas y son capaces de proliferar durante muchas generaciones o indefinidamente.

Las células que no son las APC profesionales son aisladas de cualquier tejido de un donador autólogo; un donador heterólogo o un donador xenogénico, donde residen usando una variedad de métodos de separación conocidos (Darling, *Animal Cells: Culture and Media*. J. Wiley, Nueva York, 1.994; Freshney, *Culture of Animal Cells*. Alan R. Lis, Inc., Nueva York, 1.987). Se pueden lograr células no autólogas, por ej., células heterólogas o xenogénicas, ex vivo para expresar moléculas de clase I y clase II de HLA que igualan las especificidades del HLA humano conocido. Estas células pueden ser introducidas después en un individuo humano que iguale la especificidad de HLA de las

células logradas. Las células se logran además ex vivo para expresar una o más vacunas quiméricas según la invención.

Las células logradas se mantienen en cultivo celular por métodos de cultivo celular estándar (Darling, *Animal Cells: Culture and Media*". J. Wiley, Nueva York, 1.994; Freshney, *Culture of Animal Cells*". Alan R. Lis, Inc., Nueva York, 1.987). Las estirpes celulares para uso en la presente invención se obtienen de una variedad de fuentes (por ej., ATCC Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, Colección Americana de Cultivos Tipo, 8ª edición, 1.995) o son producidas usando métodos estándar (Freshney, *Culture of Immortalized Cells*, Wiley-Liss, Nueva York, 1.996). Se prefieren estirpes celulares no transformadas para uso en individuos humanos.

En un aspecto, los precursores de CD34⁺ que se diferencian bajo la influencia de GM-CSF en células dendríticas se obtienen del cuerpo de un individuo y se introducen los ácidos nucleicos que codifican vacunas quiméricas según la invención en las células, que se vuelven a inyectar después en el individuo. Utilizar la construcción que contiene secuencias antigénicas ligadas a una señal objetivo endosomal/lisosomal (y preferiblemente que comprende un polipéptido luminal de tipo LAMP) aumentará la asociación de péptidos procedentes de un antígeno particular con moléculas de clase II del MHC en las células presentadoras de antígenos transducidas, dando como resultado respuestas inmunitarias dependientes de células T sistémicas significativamente más potentes. Aunque las células presentadoras de antígenos transinfectadas en esta estrategia son preferiblemente células autólogas, cualquier célula de clase II del MHC que presente antígeno de manera eficaz en el huésped se puede usar como se describió anteriormente.

Vacunas de péptidos

También están dentro del alcance de esta invención vacunas que contienen inmunógenos peptídicos sin células, donde el inmunógeno contiene un dominio del antígeno y secuencias de un polipéptido de membrana lisosomal (por ej., tal como un polipéptido de LAMP o un homólogo, ortólogo, variante o versión modificada de los mismos) o secuencias de un receptor endocítico para fijar como objetivo y transportar el antígeno a un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas para unirse a una molécula de clase II del MHC o para suministrar a otro compartimento/organelo para unirse a una molécula de clase II del MHC. Preferiblemente, el antígeno se trata dentro del compartimento/organelo (o posterior compartimento/organelo a que se suministra) para generar un epítipo unido a una molécula de clase II del MHC capaz de modular una respuesta inmunitaria.

La vacuna quimérica también puede comprender una región transmembrana y/o cola citoplasmática con región de objetivo lisosomal (preferiblemente de un polipéptido de LAMP) y/o dominio de di-leucina, Unidad Tyr, dominio MR6, dominio rico en prolina y/o dominio Ser-Val-Val. La vacuna quimérica también puede unirse en una estructura membranosa para facilitar su administración al cuerpo de un organismo. Por ejemplo, la vacuna quimérica se puede reincorporar en liposomas, como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 4.448.765.

Cuando una proteína o polipéptido se tiene que usar como inmunógeno, se puede producir por expresión de una o más cualquiera de las construcciones de ADN descritas anteriormente en una célula recombinante o se puede preparar por síntesis química. Por ejemplo, se puede usar la técnica Merrifield (*Journal of American Chemical Society*, vol. 85, págs. 2.149-2.154, 1.968).

Administración

El material de la vacuna según esta invención puede contener las construcciones estimuladoras inmunitarias descritas anteriormente o puede ser microorganismos recombinantes o células presentadoras de antígenos que expresen las construcciones estimuladoras inmunitarias. La preparación de composiciones que contienen material de la vacuna según esta invención y la administración de dichas composiciones para inmunización de individuos se llevan a cabo según principios de inmunización que son conocidos para los expertos en la materia.

Se pueden obtener grandes cantidades de estos materiales por cultivo de células recombinantes o transformadas que contienen replicones que expresan el ADN quimérico descrito anteriormente. Los métodos de cultivo son conocidos para los expertos en la materia y son explicados en uno o más de los documentos citados anteriormente. El material de la vacuna es producido en general por cultivo de células recombinantes o transformadas y formulado en una disolución o suspensión farmacológicamente aceptable, que normalmente es una disolución acuosa fisiológicamente compatible o en comprimidos recubiertos, comprimidos, cápsulas, supositorios o ampollas, como se describe en la técnica, por ejemplo en la Patente de EE.UU. Nº 4.446.128, incorporada en la presente memoria por referencia. La administración puede ser cualquier ruta adecuada, incluyendo oral, rectal, intranasal o por inyección donde la inyección puede ser, por ejemplo, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

La composición de vacuna es administrada a un mamífero en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero. Una cantidad mínima preferida para administración es la cantidad requerida para provocar la formación de anticuerpo a una concentración al menos 4 veces la que existía antes de la administración. Una dosis inicial típica para administración sería 10- 5.000 microgramos cuando se administra por vía intravenosa,

por vía intramuscular o por vía subcutánea o 10^5 a 10^{11} unidades de formación de placas de un vector recombinante, aunque esta cantidad puede ser ajustada por un médico haciendo la administración como tiene lugar comúnmente en la administración de vacunas y otros agentes que induzcan respuestas inmunitarias. Una única administración puede ser suficiente normalmente para inducir inmunidad, pero se pueden realizar múltiples administraciones para asegurar o reforzar la respuesta.

Las vacunas se pueden ensayar inicialmente en un mamífero no humano (por ej., un ratón o primate). Por ejemplo, se pueden usar ensayos de las respuestas inmunitarias de ratones inoculados para demostrar mayores anticuerpos, proliferación de células T y respuestas de células T citotóxicas a las proteínas quiméricas de objetivo lisosomal que el antígeno natural. Las proteínas quiméricas se pueden evaluar en monos Rhesus para determinar si una formulación de vacuna de ADN que es muy eficaz en ratones también provocará una respuesta inmunitaria en monos apropiada. En un aspecto, cada mono recibe un total de 5 mg de ADN por inmunización, IM suministrado y dividido entre 2 sitios, con inmunizaciones el día 0 y las semanas 4, 8 y 20, con una dosis adicional opcional. Se pueden medir las respuestas de los anticuerpos, la producción de citocina de células T ADCC, $CD4^+$ y $CD8^+$, la tinción de citocina específica del antígeno de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ para controlar las respuestas inmunitarias a la vacuna.

Más descripción de métodos adecuados de formulación y administración según esta invención se pueden encontrar en la Patente de EE.UU. N° 4.454.116 (construcciones), la Patente de EE.UU. N° 4.681.762 (bacterias recombinantes) y las Patentes de EE.UU. Nos. 4.592.002 y 4.920.209 (virus recombinante).

Inmunotolerancia y autoinmunidad

Muchas enfermedades autoinmunitarias muestran una correlación con ciertos haplotipos de clase II del MHC y están asociadas a la producción anormal de autoanticuerpos, que sugiere que la generación de células T $CD4^+$ restringidas de clase II del MHC autoreactivas es una etapa patogénica importante. Dado que las células $CD4^+$ pueden ser inactivadas o anergizadas, en ciertas circunstancias, por acoplamiento de su receptor de células T en ausencia de una segunda señal (tal como el co-acoplamiento de CD28 por su ligando B7), sigue que la presentación eficaz de un antígeno restringido de clase II del MHC sobre una célula de clase II del MHC que no muestra la segunda señal apropiada representaría un tolerágeno eficaz. La generación de esta tolerancia o inactivación de ciertas células T $CD4^+$ se podía usar para interrumpir las respuestas inmunitarias anormales en enfermedades autoinmunitarias.

En la realización de este principio, se induciría una célula presentadora del antígeno deficiente (que no expresaba ninguna señal co-estimuladora) para expresar clase II del MHC o se transinfectaría con los genes de clase II del MHC apropiados. Esta célula se transduciría después adicionalmente con el auto-antígeno de interés, tal como el receptor de acetilcolina en el caso de miastenia grave, unido a la señal objetivo endosomal/lisosomal. La inyección de estas células en el huésped daría como resultado la interrupción de las respuestas de las células T contra el antígeno, basándose en la presentación eficaz de secuencias peptídicas sobre moléculas de clase II del MHC a receptores de células T sobre células T $CD4^+$ en ausencia de las señales co-estimuladoras apropiadas (señales que se proporcionan por las células presentes de antígeno eficaces).

Inmunoterapia del cáncer

Candidatos para prevención y tratamiento

Los candidatos a inmunoterapia del cáncer serían cualquier paciente con un cáncer que posea un antígeno específico del tumor definido e indefinido cuyo gen se pueda clonar y modificar por las secuencias objetivo lisosomales/endosomales de LAMP como se describe en la presente memoria. Ejemplos incluyen pacientes con linfomas asociados a virus de Epstein-Barr documentados, pacientes con carcinomas cervicales asociados a HPV, pacientes con HCV crónica o pacientes con una reordenación o mutación definida en un oncogen o gen supresor de tumor. Se prevé que el tratamiento con una vacuna que incorpora el antígeno del tumor unido a las secuencias de transporte y objetivo endosomal/lisosomal en una vacuna vírica se podía utilizar en cualquier periodo durante el desarrollo del cáncer del individuo, una vez que es identificado. También es posible que en pacientes de alto riesgo, se podía realizar la vacunación para evitar la aparición posterior de un cáncer con un antígeno específico del tumor definido.

Procedimiento para tratamiento

En una realización, se produciría vacuna vírica recombinante que contiene el antígeno unido a la secuencia de transporte y objetivo lisosomal/endosomal incorporada en una vacuna vírica tal como vaccinia, en grandes cantidades como se describió anteriormente y se inyectaría en el paciente en cualquier momento adecuado durante el desarrollo de su tumor maligno. Preferiblemente, se inyectaría la vacuna en una fase cuando la carga del tumor fuera baja. En una realización alternativa en que se introduce esta construcción en las células presentadoras de

antígenos del individuo, son extraídos precursores a las células presentadoras de antígenos o células presentadoras de antígenos maduras de la médula ósea del individuo o sangre periférica por punción de la vena. Estas células se establecen en cultivo seguido por la transducción con la construcción quimérica. Una vez que ha tenido lugar la transducción, se vuelven a inyectar en el paciente estas células presentadoras de antígenos.

En una realización preferida particular, la invención proporciona un método de tratamiento para un paciente con cáncer que tiene baja carga tumoral, tal como temprano en la enfermedad, después de la resección de un tumor neoplásico o cuando la carga de células tumorales se reduce de otro modo. En este método, una vez que se ha identificado una característica del antígeno de la superficie de las células específica del tumor del tumor del paciente, se obtiene del paciente una población de células que contiene hemocitoblastos autólogos capaces de diferenciación en células presentadoras de antígenos que expresarán moléculas de clase II del MHC. Estas células son cultivadas y transformadas por introducción de una molécula de ADN heteróloga o quimérica que codifica una proteína que contiene al menos un epítipo del antígeno específico del tumor encontrado en las células del tumor del paciente y un dominio de transporte luminal de un polipéptido de membrana asociado a lisosomas (por ej., polipéptido de LAMP, homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos) o el dominio de transporte luminal de un receptor endocítico y un dominio objetivo citoplasmático de un polipéptido de LAMP, homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos o de un receptor endocítico para fijar como objetivo el antígeno para un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas y para asociación con una molécula de clase II del MHC dentro del compartimento/organelo o dentro de otro compartimento/organelo al que se suministra el antígeno. Dichas moléculas de ADN quimérico pueden codificar secuencias de dominio adicionales como se describió anteriormente (por ej., secuencias que codifican dominios transmembrana; secuencias señal, dominios citoplasmáticos para fijar como objetivo a un compartimento endosomal/lisosomal u organelos relacionados con lisosomas, dominios de di-leucina, dominios de unidades Tyr, dominios ricos en prolina, dominios Ser-Val-Val y similares).

La población de hemocitoblastos transinfectados se reintroduce después en el paciente, donde los hemocitoblastos se diferencian en las células presentadoras de antígeno que expresan moléculas de clase II del MHC complejadas con epítopos T_H del antígeno específico del tumor. La respuesta inmunitaria al antígeno específico del tumor aumentará por estimulación aumentada de la población de células T auxiliares.

Más en general, en una realización, esta invención proporciona una composición de vacuna para modular una respuesta inmunitaria en un mamífero a un antígeno (es decir, estimular, aumentar o reducir dicha respuesta). Preferiblemente, la composición comprende un vector de vacuna, en la que el vector contiene un segmento de ADN quimérico que codifica una proteína que contiene al menos un epítipo del antígeno específico del tumor encontrado en las células del tumor del paciente y un dominio de transporte luminal de un polipéptido de membrana asociado a lisosomas (por ej., polipéptido de LAMP, homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos) o del dominio de transporte luminal de un receptor endocítico y un dominio objetivo tal como el dominio objetivo citoplasmático de un polipéptido de LAMP, homólogo, ortólogo, variante o forma modificada de los mismos o de un receptor endocítico, para fijar como objetivo al antígeno para un compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas y para asociación con una molécula de clase II del MHC dentro del compartimento/organelo o dentro de otro compartimento/organelo al que se suministra el antígeno. Dichas moléculas de ADN quimérico pueden codificar secuencias de dominio adicionales como se describió anteriormente (por ej., secuencias que codifican dominios transmembrana; secuencias señal, dominios citoplasmáticos para fijar como objetivo a un compartimento endosomal/lisosomal u organelos relacionados con lisosomas, dominios de di-leucina, dominios de unidades Tyr, dominios ricos en prolina, dominios Ser-Val-Val y similares. Estuches

La invención comprende además estuches para facilitar la realización de los métodos descritos en la presente memoria. En un aspecto, un estuche comprende un vector de ácidos nucleicos como se describió anteriormente y una célula para recibir al vector. El estuche puede comprender adicionalmente uno o más ácidos nucleicos para lograr la célula en una APC profesional. En un aspecto, sin embargo, la célula es una APC profesional. La célula puede o no expresar moléculas co-estimuladoras. En un aspecto preferido, cuando la célula no expresa moléculas co-estimuladoras, el antígeno codificado por el vector es un autoantígeno. En otro aspecto, se proporciona un panel de células que expresan diferentes moléculas de MHC (por ej., conocido que se expresan en seres humanos). En un aspecto más, el estuche comprende reactivos para facilitar la entrada de los vectores en una célula (por ej., las formulaciones a base de lípidos, materiales de empaquetamiento vírico, células y similares). En aún un aspecto más, se proporciona una o más estirpes celulares T específicas para el antígeno codificado por el vector para provocar, modular o aumentar una respuesta inmunitaria.

Ejemplos

La invención se ilustrará ahora además con referencia a los siguientes ejemplos. Se apreciará que lo que sigue es como ejemplo sólo y que se pueden hacer modificaciones para detalle sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Expresión de alto nivel de gag de VIH-1 in vitro por plásmidos que contienen antígeno insertado en las secuencias LAMP completas y las secuencias repetidas terminales invertidas del virus adenoasociado.

Se construyó una serie de diferentes construcciones de ácidos nucleicos que codifican vacunas quiméricas.

Un plásmido capaz de provocar un alto nivel de expresión de Gag como una proteína de fusión con LAMP en células transfectadas se muestra en la Figura 1. La expresión de Gag por este plásmido es comparada con la de una serie de otras construcciones de plásmido en la figura. Por ejemplo, el Plásmido 1 comprende el gen Gag [VIH-1] natural en la cadena principal del vector de pcADN3.1 (Invitrogen). El Plásmido 2 comprende una quimera de gag que contiene secuencia señal de LAMP, dominios transmembrana y citoplasmático, en pcADN3.1. El Plásmido 3 comprende una quimera con Gag insertado entre los dominios transmembrana/citoplasmático del ADN de LAMP completo en pcADN3.1. El Plásmido 4 muestra VIH_{Gag}ΔINS¹⁵ que contiene mutaciones de las secuencias inhibitoras de Gag en pcADN3.1. El Plásmido 5 comprende VIH_{Gag}ΔINS¹⁵ con la secuencia señal de LAMP, dominios transmembrana y citoplasmático pcADN3.1. El Plásmido 6 comprende cadena principal de vector p43 que contiene AAV-ITR y que codifica Gag natural. El Plásmido 7 muestra una cadena principal de vector p43 que contiene gag insertado en LAMP de longitud completa como en el plásmido 3.

Los datos muestran, como se esperaba, que el plásmido (#1) de control y el que contiene la quimera (#2) transmembrana y de cola citoplasmática Gag/LAMP no mostraban expresión de proteínas significativa. Por el contrario, este experimento dio como resultado el nuevo hallazgo de fuerte expresión de Gag con el gen gag incluido dentro del gen (#3) de LAMP completo. La cantidad de proteína Gag expresada fue notablemente mayor que la del plásmido que codifica Gag con las secuencias INS mutadas solas (#4) o como una quimera con la (#5) transmembrana y cola citoplasmática de LAMP. Un hallazgo más e incluso más notable fue la expresión de la proteína Gag relativamente grande del plásmido p43 que contiene las secuencias AAV ITR y el gen gag incorporado en la secuencia (#7) de LAMP completa. La misma construcción de plásmido p43 pero sin las secuencias de LAMP mostró muy poca expresión (#6) de Gag. Se observó una expresión de proteínas similar a la observada con plásmido #7 en este experimento después de transfección de diversas estirpes celulares (COS, 293T, 3T3).

Así, insertar Gag de VIH cerca del lado extracelular del dominio transmembrana de LAMP-1 de ratón de longitud completa da como resultado una expresión mucho mayor de Gag de VIH como una proteína de fusión con LAMP cuando se compara con el Gag natural o Gag modificado sólo con la secuencia señal de traslocación del retículo endoplasmático de LAMP y la expresión de Gag que fue mayor incluso que la del plásmido que codifica Gag con las secuencias INS mutadas. Además, La expresión de Gag de nuestra nueva quimera Gag-LAMP de VIH fue notablemente más aumentada por un vector de ADN de plásmido con secuencias no traducidas de las repeticiones terminales invertidas (las ITR) del virus adenoasociado (AAV) (vector p43).

Ejemplo 2. Evaluación de la respuesta inmunitaria de ratones para plásmidos que codifican una proteína quimera de LAMP/VIH-1 Gag completa.

Se encontró que la expresión de alto nivel en células transfectadas de proteína Gag como una quimera de aproximadamente 200 kDa (ensayada por anticuerpos anti-Gag) resultaba de inserción de la secuencia p55Gag del VIH-1 debajo de la secuencia codificadora del dominio luminal de LAMP (1.113 pb) (construcción #3 Figura 7E). Por otra parte, la expresión de Gag fue notablemente multiplicada además incluyendo AAV ITR en el vector de expresión. Se observó expresión aproximadamente 40 veces mayor para esta construcción que para una construcción LAMP/Gag sin dichas secuencias cuando se determina por densitometría. Esta expresión fue 200 veces mayor que la expresión de Gag natural (construcción #7 Figura 7E). Hubo mínima expresión de la proteína Gag en células transfectadas con plásmidos que carecían del dominio luminal LAMP, incluso en plásmidos que contenían la ITR (construcciones #1, 2, 6 Figura 7E). Así, la expresión de alto nivel de Gag requería el dominio luminal de LAMP.

Se analizó la localización celular de LAMP/Gag por transfección de la estirpe celular de fibroblastos de ratón DCEK.ICAM.Hi7, que expresa moléculas I-Ek de clase II de MHC, ICAM-1 y B7-1 y pueden presentar péptidos pretratados a células CD4 T sin tratamiento previo. Se ha demostrado que las moléculas de clase II de esta estirpe celular se colocan con LAMP-1. La tinción de anti-Gag monoclonal de células DCEK transfectadas con Gag natural reveló una distribución citoplasmática difusa de la proteína natural. Por el contrario, las DCEK transfectadas con la construcción LAMP/Gag y teñidas con anti-Gag mostraron una colocación acusada de la quimera LAMP/Gag con MHC II en diversas vesículas altamente marcadas.

La capacidad de las proteínas quiméricas para modular una respuesta inmunitaria también se evaluó. Se inmunizaron grupos de seis ratones con 50 µg de ADN en la base de la cola los días 0, 30, 60 y 90 con las siguientes construcciones de plásmidos como sigue. Se obtuvieron muestras de sangre los días -1, 29, 59 y 89 y se sacrificó la mitad de los ratones los días 70 y 100. Se examinaron los efectos de diversas construcciones: 1) Gag natural pcADN; 2) dominios transmembrana y citoplasmático de secuencia señal LAMP /Gag/LAMP de pcADN ; 3) dominio luminal de pcADN de LAMP/Gag/dominios transmembrana y citoplasmático de LAMP; 4) secuencias inhibitoras mutadas de Gag de pcADN; 5) secuencia señal de pcADN / secuencias inhibitoras mutadas/ dominios

transmembrana y citoplasmático de LAMP; 6) Gag natural (AAV-ITR) p43 y 7) dominio luminal (AAV-ITR) de dominios transmembrana y citoplasmático LAMP/Gag/LAMP p43.

Se ensayó la respuesta de los anticuerpos específicos de VIH en cada ratón a dilución 1:100 del plasma recogido el día 59, después de dos inmunizaciones. Los datos se muestran como el promedio de estos ensayos individuales (n=5) (Figura 2). El gen Gag codificado en el ADNc de LAMP de longitud completa, en particular el contenido en el vector p43, provocó una respuesta inmunitaria mucho más fuerte que la que tuvo cualquiera de las demás construcciones. Las construcciones GagINS provocaron menores respuestas mientras que no hubo respuesta para ninguna de las construcciones del gen Gag natural. La asociación de la quimera LAMP/gag de longitud completa y el plásmido AAV son notablemente más inmunógenas que ninguna de las construcciones de vacuna de ADN convencionales.

También se ensayaron los sueros mezclados recogidos después de la segunda y cuarta inmunización, los días 59, 89 y 119, para el título de la respuesta del anticuerpo (Figura 3). El título del anticuerpo específico de Gag de ratones inmunizados con secuencias de Gag junto con la secuencia de LAMP completa en el vector p43 fue notablemente mayor que el de cualquiera de los otros inmunógenos, con un título de ~ 300.000 en experimentos repetidos. Por otra parte, el título de la respuesta anti-Gag fue máximo en dos inmunizaciones. El plásmido pcADN3.1 que contiene secuencias de Gag en la secuencia LAMP completa también provocó un título significativo pero mucho menor. Los plásmidos restantes, incluyendo el pcADN3.1 Gag Δ INS, mostraron poca inmunogenicidad en este experimento.

Experimentos adicionales con la construcción LAMP/Gag segregada que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático y una construcción LAMP/Gag de membrana de plasma que carece de la secuencia objetivo lisosomal YQTI demostraron que la respuesta de los anticuerpos aumentada del ADN LAMP/Gag requería transporte lisosomal. Así, la alta expresión de proteínas de un Gag segregado fracasó en provocar una respuesta comparable para el Gag transportado de LAMP, a pesar de la esperanza de que un Gag segregado favorecería una respuesta de los anticuerpos. Adicionalmente, no hubo mayor respuesta de los anticuerpos co-inyectando ADN codificador de proteínas naturales de LAMP/Gag y Gag, que implica que la proteína Gag adicional no transportada a los lisosomas no tenía efecto en la respuesta de los anticuerpos y que el elemento limitante en esta inmunización fue la respuesta del auxiliar T CD4⁺.

Los ensayos de expresión de ARN IL-2 e IL-4 mediada por CD4 y la producción de proteína IFN- γ , en la estimulación de células del bazo con proteína recombinante Gag p55 mostraron todos una respuesta mucho más fuerte para inmunización con el plásmido LAMP/Gag que con plásmidos carentes de la LAMP completa (Figuras 7A-D). Aunque esta diferencia se podía atribuir a la ausencia de expresión de la proteína Gag en el caso de inmunización con ADN natural de Gag, el LAMP/Gag segregado también fue inferior como inmunógeno. Los resultados fueron específicos para células CD4⁺ ya que la producción de IFN- γ no fue inhibida por incubación previa de esplenocitos con un anticuerpo monoclonal anti-CD8, mientras que estuvo completamente bloqueado por el tratamiento de las células mediante un anticuerpo anti-CD4. La inmunización combinada con Gag natural y LAMP/Gag no condujo a una respuesta de CD4 aumentada.

Las vacunas de ADN pueden generar respuestas de las células T CD8⁺ pero el cebado máximo de células CD8⁺ sin tratamiento previo requiere actividad de CD4⁺. Se midieron las respuestas mediadas por CD8⁺ específicas de Gag para una inmunización única de 50 μ g de ADN por expansión in vivo con vacuna recombinante-Gag-Pol (rVVGag-Pol) durante 5 días y activación por el péptido Gag restringido de H2Kd inmunodominante durante 2 h. Los ratones inmunizados con ADN de LAMP/gag mostraron de manera uniforme una respuesta de CD8⁺ notablemente mayor que la que tuvieron los inmunizados con gag natural o la quimera LAMP/Gag segregada. Los resultados fueron comparables con cada uno de tres ensayos, unión a tetrámero de Gag, tinción de IFN- γ intracelular y muerte celular específica de Gag. La eliminación de células CD8⁺ de la población efectora suprimió el efecto. La co-inmunización con un plásmido que codifica Gag natural para aumentar proteína Gag suministrada a la ruta de MHC I de las células transfectadas no aumentaron las respuestas mediadas por CD8⁺, que indica que a pesar del objetivo LAMP de antígeno hubo suficiente presentación de MHC I de antígeno.

Respuesta de la dosis a la inmunización con pITR/LAMP/Gag. Los ratones inmunizados dos veces i.m. con 0,1 a 50 mg de ADN de LAMP/gag mostraron una respuesta comparable para 10 y 50 mg en ensayos de respuesta de los anticuerpos específica de Gag, producción de INF- γ de CD4⁺ y el % de INF- γ , células T CD8⁺. Las respuestas celulares parecieron requerir menores cantidades de ADN, con respuestas de CD4⁺ y CD8⁺ máximas con 10 mg de ADN y una respuesta de CD8⁺ significativa con sólo 1 mg. Otros han indicado que son necesarias dosis mayores de inmunógeno para inducir inmunidad humoral cuando se compara con respuestas celulares.

Ejemplo 3. Evaluación adicional de la respuesta inmunitaria de ratones a Gag de VIH-1 codificado como una quimera de LAMP de longitud completa en el vector de plásmido p43; un estudio repetido y controles adicionales.

Se inmunizaron grupos de 6 ratones con 50 µg de ADN en la base de la cola los días 0 y 30 con las construcciones de plásmido como a continuación. Se obtuvieron muestras de sangre los días -1, 29 y 45 y se sacrificó la mitad de los ratones el día 45. El objetivo principal de este experimento, fue confirmar el resultado inicial del plásmido p43(AAV-ITR) LAMP/Gag/TMCD e incluir inmunizaciones de control adicionales. Se evaluó una serie de diferentes construcciones: 1) p43 (AAV-ITR) (control negativo de plásmido); 2) p43 (AAV-ITR) LAMP (control negativo de LAMP sin gag); 3) Gag natural (AAV-ITR) p43; 4) dominio luminal de (AAV-ITR) p43 de dominios transmembrana y citoplasmático LAMP/Gag/LAMP; 5) Gag natural de pVax y 6) dominio luminal de pVax de dominios transmembrana y citoplasmático LAMP/Gag/LAMP.

La respuesta de los anticuerpos específicos anti-VIH el día 29 después de la primera inmunización y 15 días después de la segunda inmunización; se proporciona como el promedio de los resultados de ratones individuales a una dilución 1.300 de la muestra de plasma (n=6) (Figura 4A). Los datos muestran de nuevo que la respuesta predominante fue después de la segunda inmunización de los ratones inoculados con el dominio luminal de (AAV-ITR) p43 de los dominios transmembrana y citoplasmático LAMP/Gag/LAMP. Esta respuesta positiva se puede atribuir a dos factores: la expresión de proteína aumentada de Gag por el plásmido p43 con gen Gag insertado en las secuencias de LAMP y el transporte de LAMP de la proteína.

Se determinó el título de IgG, IgG1 e IgG2a total. Los ratones inoculados con el dominio luminal de (AAV-ITR) p43 de los dominios transmembrana y citoplasmático de LAMP/Gag/LAMP presentaron un título de IgG e IgG1 total de 1:24.300 mientras que el Gag natural presentó un título de 1:900 (Fig 6, A). Además, el dominio luminal (AAV-ITR) p43 de los dominios transmembrana y citoplasmático de LAMP/Gag/LAMP presentó un título de IgG2a de 1:300 mientras el Gag natural no mostró ningún IgG2a.

La respuesta de interleucina-4 e INF gamma de células T específicas de Gag de ratones inmunizados como se describe en la Fig 5, se midió el día 45 mediante el ensayo PCR a tiempo real (Figuras 7 y 8). Se estimularon células de bazo durante la noche mediante medio (control) y medio que contenía 5 µg de proteína Gag. Se observó una fuerte respuesta específica de Gag de las células de los ratones inmunizados con plásmido LAMP/Gag p43, indicativo de la estimulación de las células Th2. En conjunto, la producción de células T de tanto INFγ como IL-4 sugiere una respuesta equilibrada de las células T a la inmunización.

Ejemplo 4. Receptor de lectina del tipo de Células C/Objetivo quimera de ADN Gag para MHC II (LAMP/Gag/DCLR).

Los receptores de lectina del tipo células T dendríticas (DCLR, por sus siglas en inglés) internalizan antígenos unidos por endocitosis adsorptiva y transporte al compartimento de MHC II donde se co-localizan con las moléculas tanto multicelulares como DC-LAMP. Los DCLR también pueden actuar en el control del carácter de la respuesta inmunitaria. Se realizaron estudios de las secuencias transmembrana y citoplasmática DEC-205 (DEC) como señales para el transporte de una proteína quimera de LAMP/p55Gag/DCLR. Las secuencias de dominio LAMP se retienen en esta construcción para aumentar la expresión de la proteína Gag. Los datos preliminares muestran que las células transfectadas con la construcción LAMP/Gag/DCLR expresan altos niveles de la proteína Gag, que Gag se colocaliza con LAMP y MHC II en las células transfectadas y que los ratones inmunizados provocan respuestas de los anticuerpos eficaces y de CD4⁺ fuertes, pero posiblemente respuestas de las células T CD8⁺ limitadas.

Construcciones de plásmido

Se usó ARN de células de médula ósea de ratón C57BL/6 como patrón para clonar el dominio transmembrana y la cola de 31 aminoácidos citoplasmática de DEC205 como un sistema DCLR modelo. Estos dominios DEC se usaron después para reemplazar el correspondiente fragmento transmembrana de LAMP y cola de 11 aminoácidos citosólica de la construcción LAMP/Gag en la cadena principal del vector pITR. Se creyó que las secuencias EDE pit y distal recubiertas proximales de membrana de DEC205 desempeñan papeles en la recirculación de DEC205 entre la membrana de plasma y el compartimento de endosomas/lisosomas tardío (Mahnke, et al, 2.000).

Las siguientes combinaciones de esta secuencia se sintetizaron en la cadena principal del vector que contenía AAV-ITR (pITR) (Figura 8): mLAMP/DEC (control negativo, sin antígeno); p55Gag (Gag de VIH-1 natural); mLAMP/p55Gag (construcción de mLAMP/p55Gag multicelular como un control positivo); mLAMP/p55Gag/DEC (construcción experimental); LAMP/p55Gag/DEC₇ (construcción de control terminada en el aminoácido 7 del dominio citoplasmático de DEC, que carece así de las secuencias objetivo del MHC II).

Expresión de la proteína quimera LAMP/Gag/DCLR

Se analizó la expresión de Gag con células COS-7 transfectadas (Figura 9). Como se esperaba, hubo Gag natural

detectable por el plásmido pITR/gag (línea 2) y niveles enormemente aumentados de las quimeras de las proteínas LAMP/Gag/DCLR (línea 3 y 4) y LAMP/Gag (línea 5). Este gel sobreexpuesto también reveló muchos fragmentos degradados de las quimeras de LAMP/Gag que reaccionan con el anticuerpo anti-Gag.

- 5 Transporte celular de quimeras de proteínas que contienen el dominio citoplasmático DEC DCLR.
La localización celular de las quimeras de LAMP/DCLR y LAMP/Gag/DCLR en células 293 humanas transinfectadas se ha examinado por microscopía de inmunofluorescencia. Como se esperaba, la quimera de mLAMP/DCLR que carece de la señal objetivo lisosomal (teñida con LAMP anti-ratón) se encontró en la membrana plasmática, por el contrario a la localización lisosomal de la LAMP humana endógena (teñida con LAMP anti-humana) (Figuras 10A-F).
10 Sin embargo y sorprendentemente, la quimera mLAMP/Gag/DCLR, se situó en las vesículas intracelulares, colocalizadas parcialmente con la LAMP endógena de la célula humana.

Respuesta inmunitaria de ratones inoculados con la quimera de ADN LAMP/Gag/DCLR

- 15 Se inmunizaron ratones BALB/c (n=8) por vía intramuscular con 50 µg de ADN (original) seguido en 3 semanas con 10 µg de ADN (refuerzo). El título de los anticuerpos de muestras tomadas 2 semanas después de la inyección de refuerzo mostró una respuesta de alto título para la construcción de LAMP/Gag/DCLR frente a la ausencia de respuesta detectable para Gag natural codificado por la construcción de ADN de Gag (Figuras 11 A, B, C1-C3). Las respuestas mediadas por CD4⁺ medidas por síntesis de ARNm de IL-4 y ensayo ELISA de producción de IFN-γ
20 fueron comparables a la respuesta de alto nivel para la construcción de LAMP/Gag estándar. Por el contrario, las respuestas de CD8⁺ a LAMP/Gag/DCLR, ensayado mediante unión de tetrámero específico de Gag y tinción IFN-γ intracelular, fueron consistentemente menores que las provocadas por LAMP/Gag. Esta diferencia de bajas CD8⁺ y altas CD4⁺ y las respuestas de los anticuerpos es objeto de investigación adicional. Hay posiblemente una deriva de Th2 en la respuesta inmunitaria para esta construcción de vacuna de quimera de DCLR.

- 25 Ejemplo 6. Construcciones del vector AAV:

Se sintetizaron las siguientes construcciones de vacuna ADN de vector AAV: AAV/LAMP (control negativo); AAV/Gag (Gag natural); AAV/LAMP/Gag (quimera LAMP/Gag); AAV/hDC-LAMP/Gag (quimera hDC-LAMP/Gag);
30 AAV/LAMP/Gag/DCLR (quimera LAMP/Gag/DCLR).

Experimentos iniciales, protocolo de inmunización.

- 35 Se han realizado dos estudios de inmunización inicial en las condiciones de nuestro protocolo convencional: ADN original, 50 µg de IM el día 1, seguido por ADN refuerzo, 10 µg de IM o refuerzo de AAV, 5X10⁹ copias genómicas, el día 21. También se inmunizaron animales sólo una vez con el vector AAV. Se sacrificaron los animales el día 31 para ensayos de respuesta de CD8⁺, el día 39-40 para ensayos de respuestas de CD4⁺ y el día 90 para ensayos de CD4⁺ y CD8⁺. Se soportaron hemorragias antes de la inmunización y a intervalos de 3-4 semanas durante todo el experimento para ensayos de anticuerpos y se continuó a intervalos mensuales de 6 meses hasta la fecha con los
40 ratones restantes. Se han iniciado hasta la fecha dos experimentos de inmunización de ratones independientes; uno es a la duración de 6 meses y el otro a 2 meses.

Respuesta inmunitaria de ratones y duración de la inmunidad, experimentos iniciales.

- 45 Respuestas inmunitarias celulares:

En general, en las condiciones de este protocolo y con los instantes de tiempo del ensayo como anteriormente, comparando ADN desnudo y el vector AAV como la inmunización de refuerzo, no hubo ventaja clara del refuerzo de AAV cuando se compara con el refuerzo de ADN desnudo, hasta el día 90.

- 50 Respuestas de los anticuerpos.

De acuerdo con la bibliografía sobre el sistema de vectores AAV, parece que una diferencia evidente para ADN desnudo es una respuesta humoral prolongada, presumiblemente debido a expresión a largo plazo del antígeno (Tabla 1). Como se observó en nuestros experimentos previos, la inoculación con la quimera de LAMP/gag provocó una respuesta de IgG específica de Gag rápida, con un título en este experimento de 72.000 dos semanas después de la inmunización de refuerzo. Sin inmunizaciones adicionales esta respuesta de IgG disminuyó rápidamente a niveles de fondo virtuales de 3-4 meses más tarde. Por el contrario, la inmunización con el vector AAV dio como resultado un comienzo más lento, pero una respuesta de IgG de título prolongado y mucho más alto. Notablemente,
55 después del AND original, la quimera de AAV/LAMP/Gag/DCLR, con un refuerzo de AAV sólo, dio como resultado un título de IgG prolongado de más de 200.000, aproximadamente 10 veces mayor que la respuesta para la construcción de AAV/LAMP/Gag. Estos datos sugieren además una deriva de Th2 del sistema de DCLR.

- 60

Tabla 1: Títulos de anticuerpos de VIH-1 de suero mezclado de ratones inmunizados*

[Esta tabla no se reprodujo]

	Día				
Vacuna	11	34	68	91	133
AAV natural	—	—	—	—	—
LAMP/Gag (ADN/ADN)	—	72.000	900	300	—
LAMP/Gag (ADN/AAV)	—	2.700	8.100	24.000	24.000
LAMP/Gag (AAV)	—	8.100	2.700	2.700	2.700
LAMP/Gag/DCLR (ADN/AAV)	—	24.000	>218.000	>218.000	218.000
LAMP/Gag/DCLR (AAV)	—	2.700	8.100	8.100	24.000

*El protocolo de inoculación se indica en los paréntesis, es decir, (ADN/ADN) indica 2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína quimérica, que comprende:
un dominio del antígeno que comprende al menos un epítipo;
un dominio luminal de un polipéptido de LAMP-1 o LAMP-2 y un dominio transmembrana; en la que el antígeno está
10 situado entre el dominio luminal y el dominio transmembrana; en la que el dominio luminal dirige las proteínas tanto
de membrana como no de membrana a un compartimento endosomal/lisosomal en una célula y/o a un organelo
relativo a lisosomas.
2. La proteína quimérica según la reivindicación 1, que comprende además un polipéptido Gag.
- 15 3. La proteína quimérica según la reivindicación 2, en la que el polipéptido Gag es insertado en una porción del
dominio luminal del polipéptido de LAMP.
4. La proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que la proteína comprende una secuencia polipeptídica de
un receptor endocítico y en la que dicha secuencia polipeptídica comprende un dominio de transporte endosomal.
- 20 5. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína comprende además uno o más
dominios seleccionados del grupo que consiste en: un dominio objetivo para fijar como objetivo una proteína a un
compartimento endosomal/lisosomal u organelo relacionado con lisosomas; un dominio señal; un dominio
transmembrana; un dominio de di-leucina; un dominio de unidades Tyr; un dominio rico en prolina y un dominio Ser-
Val-Val.
- 25 6. La proteína quimérica según la reivindicación 5, en la que el dominio de la unidad Tyr comprende la secuencia
tetrapeptídica Tyr-Xaa-Xaa-Xbb, en la que Xaa es cualquier aminoácido y Xbb es un aminoácido hidrófobo.
- 30 7. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 6, en la que el compartimento y/u organelo comprende
moléculas de clase II del MHC.
8. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 7, en la que el transporte al compartimento y/u organelo
da como resultado tratamiento del antígeno.
- 35 9. La proteína quimérica según la reivindicación 8, en la que el antígeno tratado se expresa en la superficie de una
célula unida a una molécula de clase II del MHC.
10. La proteína quimérica según la reivindicación 4, en la que el receptor endocítico comprende el dominio de
transporte de un receptor seleccionado del grupo que consiste en: un receptor Fc, receptor complemento, receptor
40 eliminador, integrina, lectina, polipéptido DEC-205, polipéptido gp200-MR6, receptor de tipo Toll, receptores de
proteínas de choque térmico, receptores de cuerpos apoptóticos o cuerpos necróticos.
11. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 10, en la que el antígeno es seleccionado del grupo que
consiste en: una porción de un material antigénico a partir de un organismo patogénico, una porción de un material
antigénico de un polipéptido específico de cáncer y una porción de un material antigénico de una molécula asociada
45 con una respuesta fisiológica anormal.
12. La proteína quimérica según la reivindicación 11, en la que el organismo patogénico es un virus, microorganismo
o parásito.
- 50 13. La proteína quimérica, según la reivindicación 12, en la que el virus es un virus del VIH.
14. La proteína quimérica según la reivindicación 11, en la que la respuesta fisiológica anormal es una enfermedad
autoinmunitaria, una reacción alérgica, cáncer, una reacción a un trasplante o injerto, una reacción de
hipersensibilidad o una enfermedad congénita.
- 55 15. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 14, en la que el compartimento endosomal es
seleccionado del grupo que consiste en: MIIC, CIIV, melanosomas, gránulo secretor, gránulo lítico, gránulo denso en
plaquetas, gránulo basófilo, gránulo de Birbeck, fagolisosoma y lisosoma secretor.
- 60 16. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 15, en la que la proteína quimérica provoca una
respuesta inmunitaria específica del antígeno.
- 65 17. La proteína quimérica según una de reivindicaciones 1 a 16, en la que dicho compartimento u organelo

comprende un polipéptido LAMP.

18. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

19. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 18, en el que la molécula de ácido nucleico está ligada de manera operable a una secuencia de control de la expresión.

20. El vector según la reivindicación 19, en el que el vector es un vector de vacuna.

21. Un vehículo de suministro que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 18.

22. El vehículo de suministro según la reivindicación 21, en el que el vehículo es a base de lípidos, a base de virus o a base de células.

23. Una célula que comprende el vector según la reivindicación 19 ó 20.

24. La célula según la reivindicación 23, en la que la célula es una célula presentadora de antígeno.

25. La célula según la reivindicación 24, en la que la célula presentadora de antígeno es una célula presentadora de antígeno profesional o una célula presentadora de antígeno lograda por ingeniería.

26. La célula según una de reivindicaciones 23 a 25, en la que la célula expresa una molécula de clase II del MHC.

27. La célula según una de reivindicaciones 24 a 26, en la que la célula presentadora de antígeno no expresa ninguna señal co-estimuladora y el antígeno es un auto-antígeno.

28. Un estuche que comprende una pluralidad de células que comprende el vector según la reivindicación 19, en el que al menos dos de las células expresan diferentes moléculas de clase II del MHC y cada célula comprende el mismo vector.

29. Un estuche que comprende un vector según la reivindicación 20 y una célula para recibir el vector.

30. Un animal transgénico no humano que comprende al menos una célula según las reivindicaciones 23 a 27.

31. Uso de una célula según una de reivindicaciones 23 a 27, para la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un animal a un antígeno, en el que la célula expresa la proteína quimérica en el animal.

32. El uso según la reivindicación 31, en el que la célula comprende una molécula de clase II del MHC compatible con proteínas de MHC del animal, de manera que el animal no genera una respuesta inmunitaria contra la molécula de clase II del MHC.

33. El uso según una de reivindicaciones 31 ó 32, en el que el animal es un ser humano.

34. El uso según una de reivindicaciones 31 a 33, en el que la célula no expresa ninguna señal co-estimuladora y el antígeno es un auto-antígeno.

35. Uso de un vector según una de reivindicaciones 19 ó 20, para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria a un antígeno.

36. El uso según la reivindicación 35, en el que el vector es infeccioso para una célula en el animal.

37. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, en el que el antígeno es seleccionado del grupo que consiste en: una porción de un material antigénico de un organismo patógeno, una porción de un material antigénico de un polipéptido específico de cáncer y una porción de un material antigénico de una molécula asociada a una respuesta fisiológica anormal.

38. El uso según la reivindicación 37, en el que el organismo patógeno es un virus, microorganismo o parásito.

39. El uso según la reivindicación 38, en el que el virus es un virus del VIH.

40. El uso según la reivindicación 37, en el que la respuesta fisiológica anormal es una enfermedad autoinmunitaria, una reacción alérgica, cáncer o una enfermedad congénita.

41. Una proteína quimérica según la reivindicación 1, que comprende además una cola citoplasmática de DEC205.

Fig. 1: A) Representación esquemática de las diferentes construcciones de plásmidos. B) Análisis Western de células COS transfectadas con diferentes plásmidos sondados con anti-Gag).

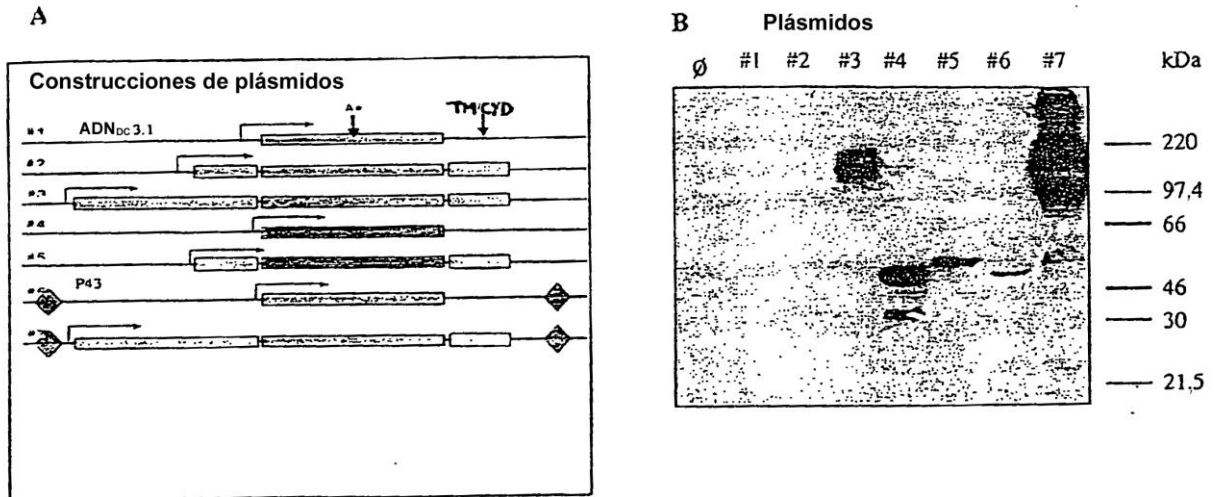


Figura 2: Respuesta de los anticuerpos de lisado de Anti-VIH, promedio de ratones individuales (n=5).

Análisis ELISA de anticuerpo que se une a proteína de un lisado de tritón-X-100 vírico de VIH-1, 50 ul de 5 ul/ml añadido a placa.

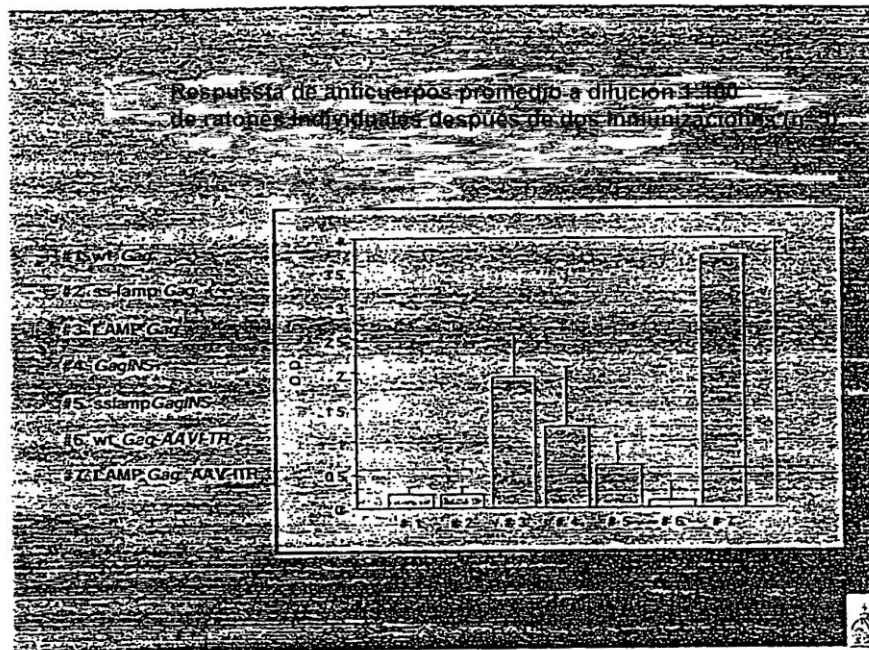
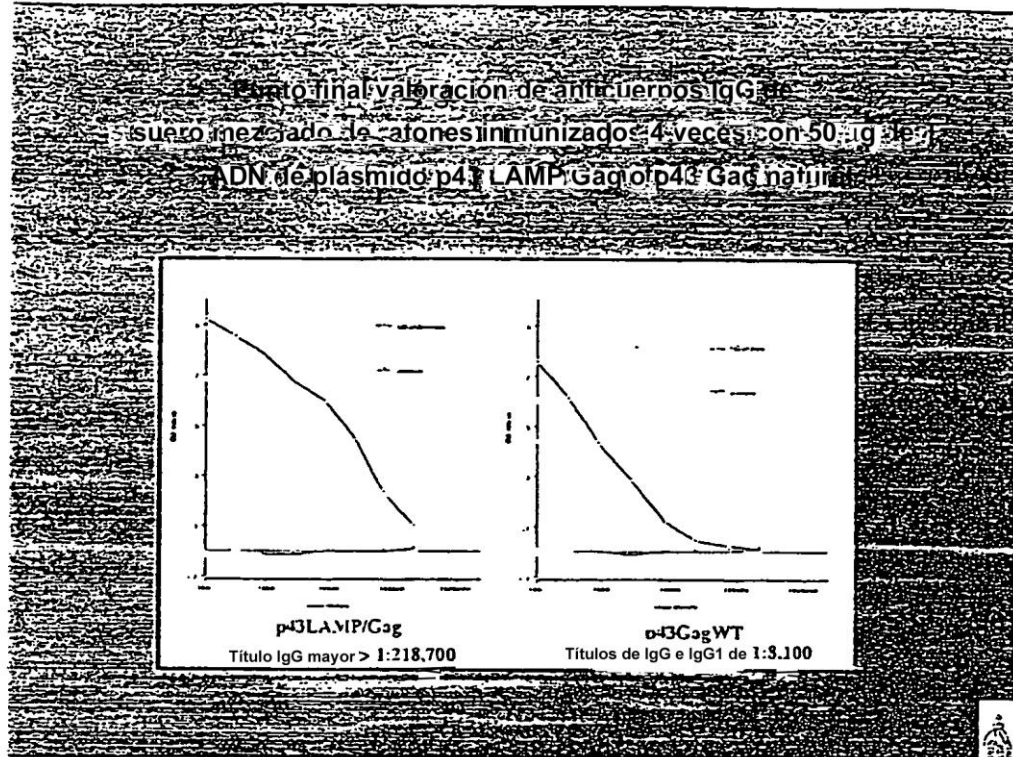


Figura 3: Título de respuesta de anticuerpos de lisado anti-VIH, inmunizaciones individuales.



FIGURAS 4A-4B Respuesta de anticuerpos de lisado Anti-VIH el día 29 después de la primera inmunización y 15 días después de la segunda inmunización; promedio de ratones individuales (n=6).

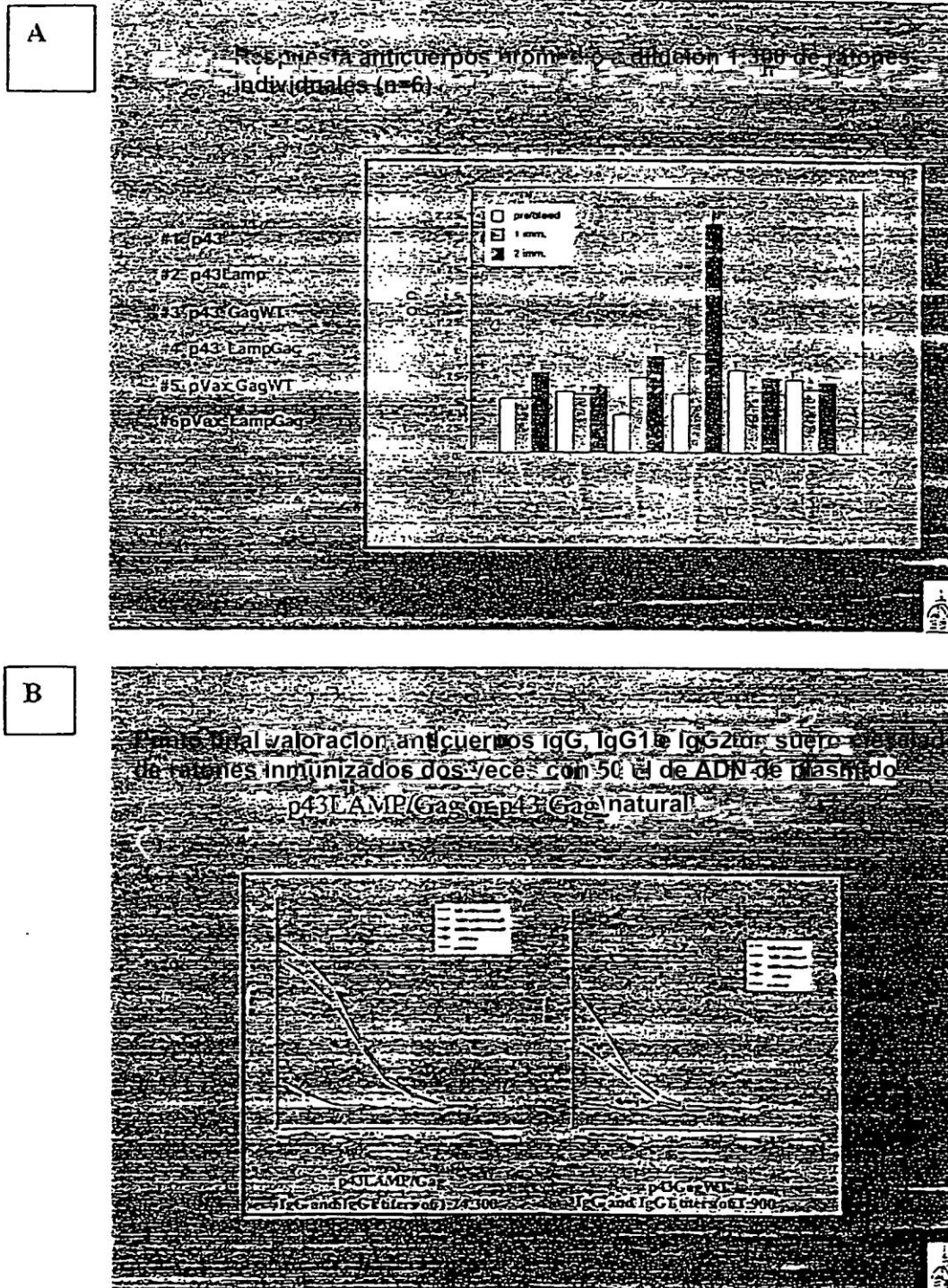
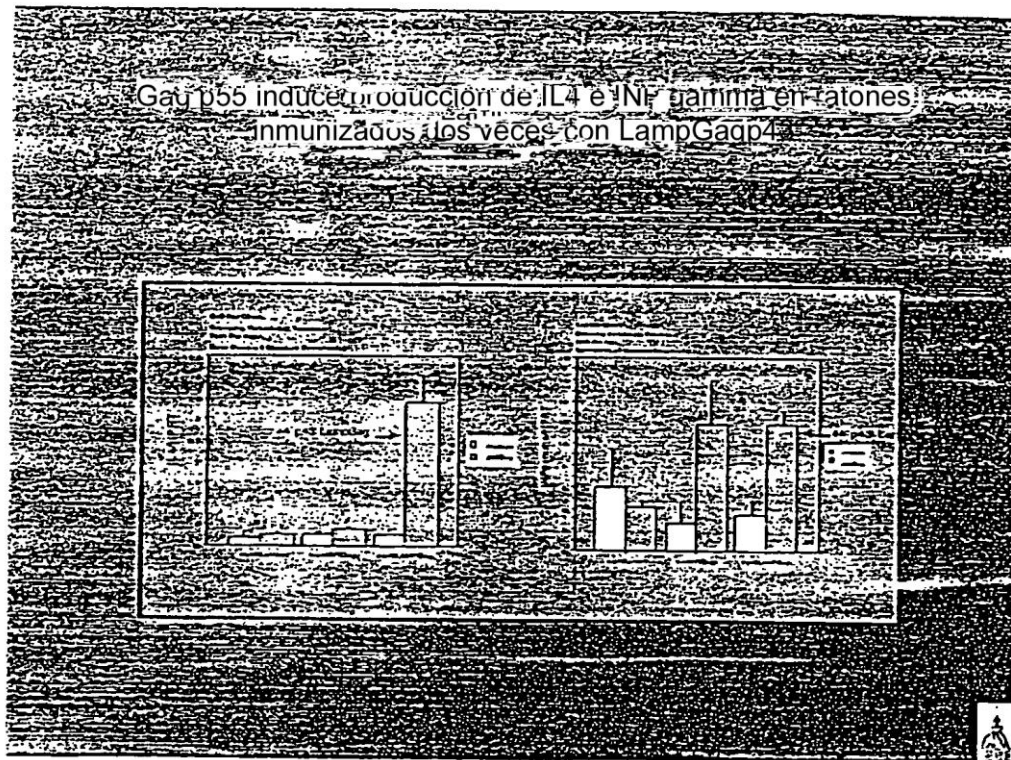


Fig. 5 Ensayo de Interferón gamma e IL-4 el día 45 después de inmunización con 50 ug de ADN los días 0 y 30. Se estimularon células de bazo por medio (control) 5 µg de proteína Gag,

IZQUIERDA: Producción de IL-4 específico de proteína Gag p55

DERECHA: Producción de INFγ específico de Gag p55



IZQUIERDA: Producción de IL4 específico de proteína Gag p55

DERECHA: Producción de INF γ específico de proteína Gag p55

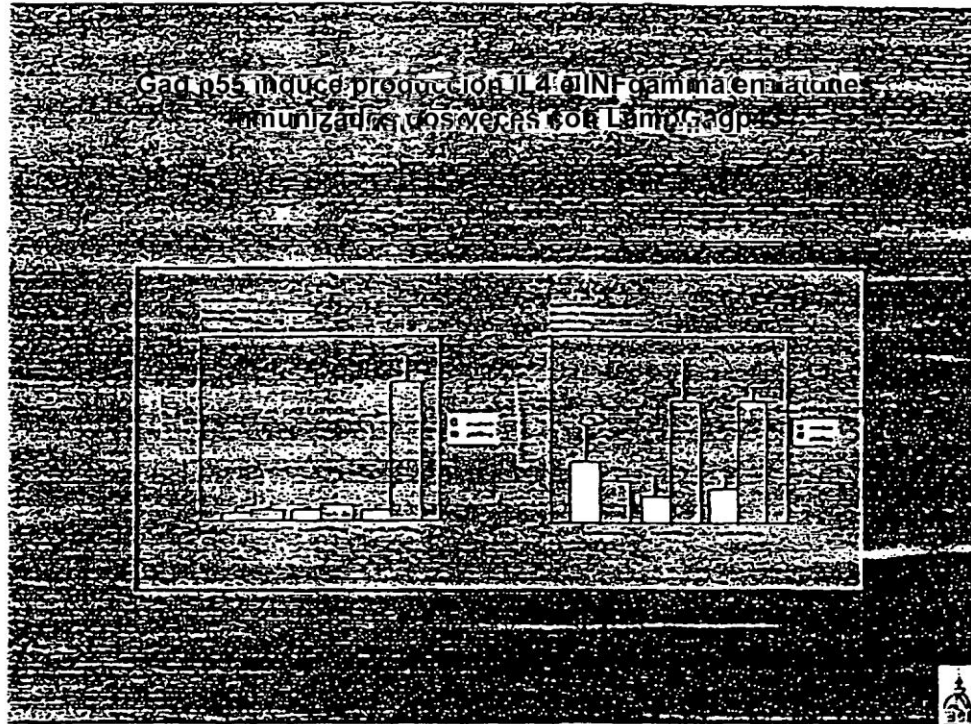


Fig.6 Ensayo PCR en tiempo real el día 45 después de inmunización con 50 ug de ADN los días 0 y 30. Se estimularon células de bazo por medio (control) y 5 µg de proteína Gag.

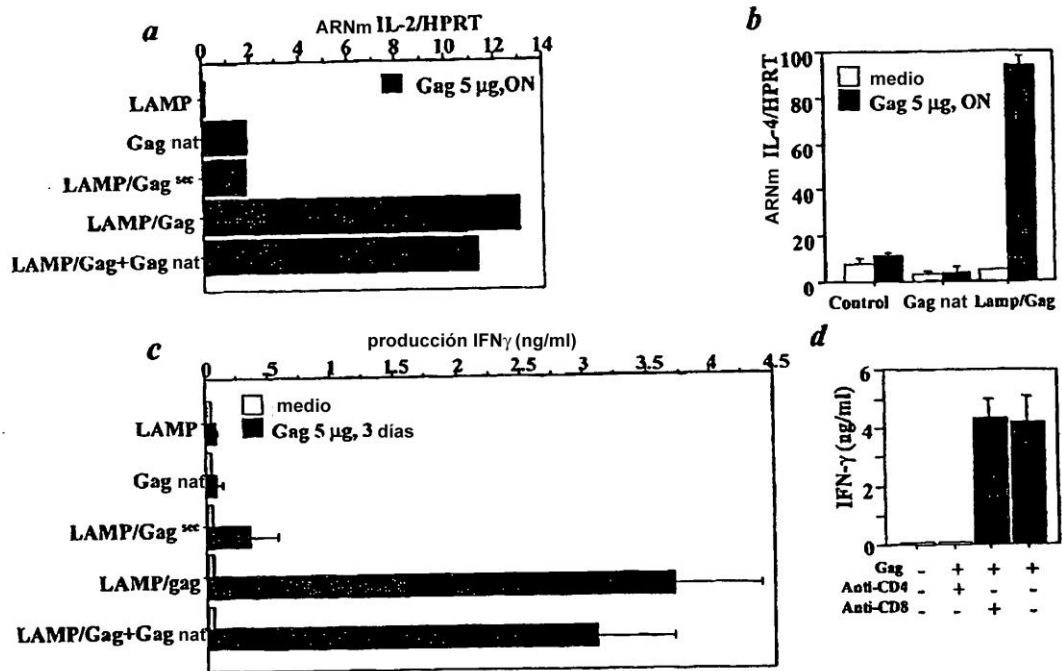


FIG. 7A-D La quimera LAMP/Gag aumenta enormemente las respuestas de la citocina mediada por CD4 específico de antígeno. Los datos se obtuvieron de esplenocitos de ratones inmunizados dos veces con el ADN de plásmido indicado e incubados con proteína p55Gag como se indicó. Los resultados son media $\pm$ D.E.a. **a.** Regulación hacia arriba específica de Gag de expresión de ARNm de IL-2. **b.** Regulación hacia arriba específica de Gag de expresión de ARNm de IL-4. **c.** Inducción específica de Gag de producción de IFN γ . **d.** Inducción específica de Gag de producción de IFN γ por esplenocitos incubados con anticuerpos de bloqueo y Gag como se indicó.

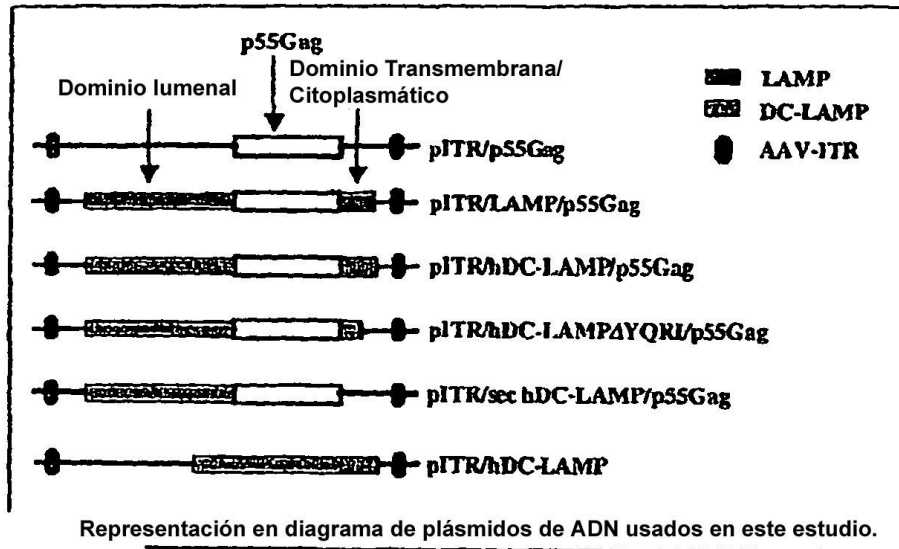
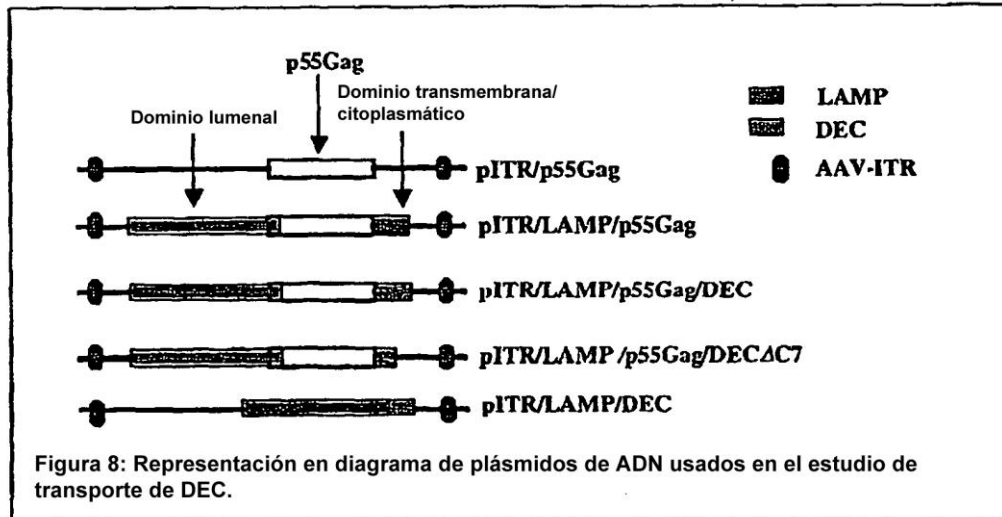
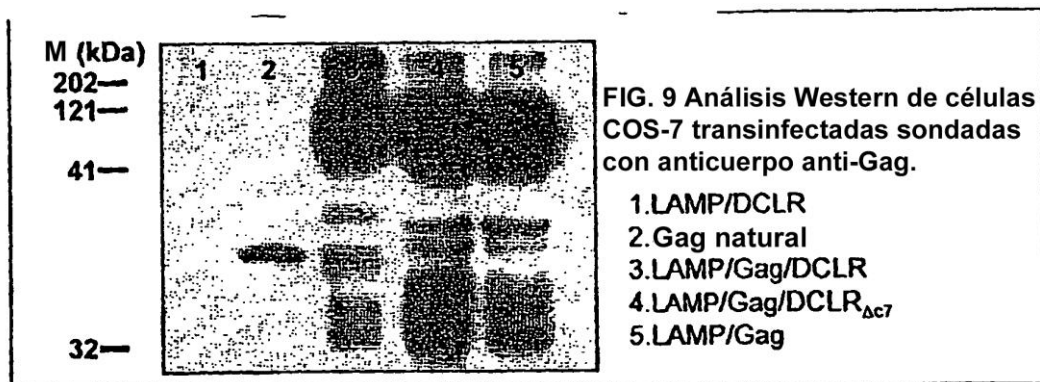
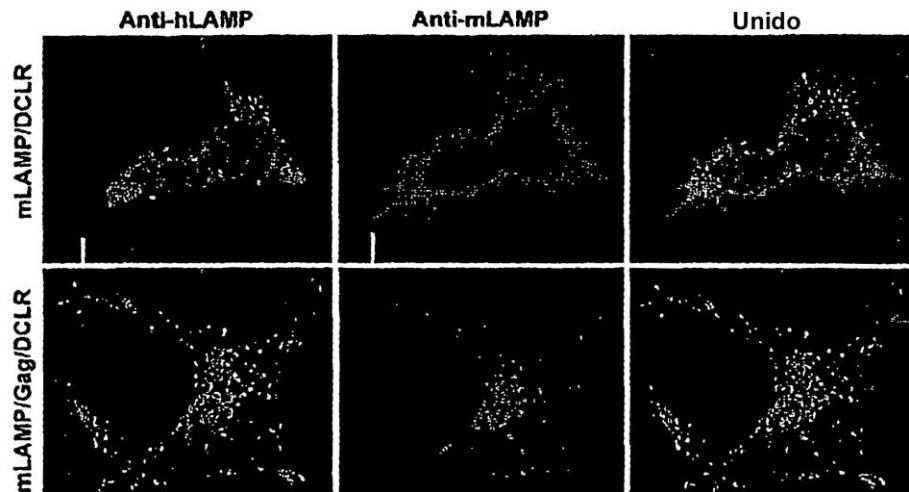


FIGURA 7E





FIGURAS 10A-F



Microscopía de inmunofluorescencia de células 293 humanas transfectadas y teñidas como se indicó. Fila superior: transfectadas con mLAMP/DCLR. Fila inferior: transfectadas con mLAMP/Gag/DCLR. Columna izquierda: teñidas con anti-hLAMP; columna media: teñidas con anti-mLAMP-1; columna derecha: imágenes superpuestas.

FIGURAS 11A-C3

