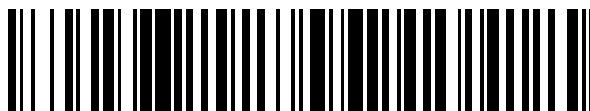


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 843**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2006 E 06829178 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1963361**

54 Título: **Complejos multiméricos de antígenos y C4bp**

30 Prioridad:

30.11.2005 EP 05292535

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

06.02.2014

73 Titular/es:

**IMAXIO (100.0%)
5/7 rue Saint Roch
75001 Paris , FR**

72 Inventor/es:

**HILL, FERGAL;
MARCHAND, JEAN-BAPTISTE y
DUMON, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 441 843 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

Complejos multiméricos de antígenos y C4bp.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a ensamblajes macromoleculares, tales como proteínas de fusión, que comprenden un adyuvante y un antígeno, ensamblajes los cuales provocan una respuesta inmunitaria potenciada frente al antígeno en comparación con el antígeno solo.

10 Antecedentes de la invención

Se necesitan métodos mejorados de inmunización tanto para mejorar las vacunas actuales como para crear unas nuevas. Al mismo tiempo, existe la necesidad de minimizar o evitar el uso de adyuvantes, ya que sólo se ha dado a conocer un número muy limitado para uso en seres humanos, y hay un deseo muy extendido de minimizar su uso en animales, a fin de reducir el sufrimiento animal.

Las solicitudes de patentes recientes describen el uso de dominios de oligomerización C4bp de mamíferos para incrementar la inmunogenicidad de antígenos en mamíferos. Estas solicitudes incluyen los documentos PCT/IB2004/002717 y PCT/EP03/08926. Una patente previa, WO 91/11461, explicó el uso de proteínas de fusión de C4bp para la inmunización, pero no se demostraron inmunizaciones exitosas. El documento PCT/EP03/08928 describe métodos para producir las proteínas de fusión de C4bp de mamíferos. Sin embargo, hasta la fecha, no se conoce ningún dominio de oligomerización C4bp para una especie no mamífera. Puesto que hay un considerable interés en la vacunación de especies no mamíferas, por ejemplo de pájaros frente a la gripe aviar, sería de utilidad considerable un dominio de oligomerización C4bp derivado de tales especies.

Oshiumi *et al.* (2005 J. Immunol. 175, 1724-1734) han caracterizado el regulador del locus de activación del complemento en el pollo, y han identificado tres proteínas que denominaron CREM, CREG y CRES. Se caracterizaron los transcritos de cada gen, permitiendo que se dedujeran las secuencias proteicas completas. Una de estas proteínas, CRES, se describió como el gen C4bp del pollo.

Sumario de la invención

Se ha encontrado una nueva secuencia proteica codificada por una secuencia de ADN también encontrada en el locus de RCA del pollo, pero distinta de cualesquiera de las secuencias descritas por Oshiumi *et al.* La secuencia de ADN de 189 nucleótidos y el dominio proteico de 62 aminoácidos que codifica se muestran en la figura 1. Se hace referencia a este dominio como el dominio de oligomerización C4bp del pollo.

La presente invención proporciona así un producto que comprende:

un primer componente de un dominio C4bp capaz de formar multímeros y que tiene al menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID n°: 1; y

un segundo componente de un antígeno.

Los componentes primero y segundo pueden estar en forma de una proteína de fusión. En una alternativa, pueden estar acoplados químicamente, a través de una cadena lateral de aminoácidos del primer componente o a través de la cadena lateral de un aminoácido que se ha añadido al primer componente específicamente para permitir el acoplamiento químico del segundo componente.

Los componentes primero y segundo también pueden estar asociados de forma no covalente entre sí. Por ejemplo, la cadena lateral de un aminoácido del primer componente se puede modificar para que tenga un grupo biotina adicional, y esta biotina se puede usar para combinarla con estreptavidina (en el que la estreptavidina es el segundo componente), o se puede combinar un antígeno fusionado a estreptavidina con el primer componente a través de esta biotina. En otra posibilidad, el antígeno biotinilado y el primer componente biotinilado se pueden mantener juntos firmemente pero de forma no covalente añadiendo estreptavidina y purificando los complejos que resultan. Estos ejemplos de asociación no covalente son meramente ilustrativos, y los expertos en la técnica entenderán que se pueden utilizar otros tipos de asociación no covalente, que conducen de forma deseable a una unión no covalente fuerte de los dos componentes.

Para evitar dudas, la designación de componentes "primero" y "segundo" no implica o indica un orden lineal específico en el producto de los dos componentes. Los dos componentes se pueden unir en cualquier orden. Aunque en un aspecto preferido el producto comprenderá los componentes primero y segundo en una relación 1:1, también está dentro del alcance de la invención que más de un primer componente se puede asociar con un segundo componente, o *viceversa*. Por ejemplo, la relación de un primer a un segundo componente puede ser 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 o 4:1. Cuando la relación es distinta de 1:1, se prefiere un exceso de segundo componente.

De este modo, cuando ambos componentes son polipéptidos y el producto se obtiene como una proteína de fusión, el orden N- a C-terminal de los dos componentes puede ser en cualquier permutación.

5 La invención proporciona además ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de dichos componentes primero y segundo. La invención también proporciona vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, y células hospedantes que poseen dichos vectores.

En otra realización, la invención proporciona un método para obtener un producto que comprende:

10 un primer componente de un dominio C4bp capaz de formar multímeros y que tiene al menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID n°: 1; y

15 un segundo componente de un antígeno polipeptídico, comprendiendo el método expresar ácido nucleico que codifica los dos componentes en forma de una proteína de fusión, y recuperar el producto.

Los métodos para obtener el producto se pueden llevar a cabo en células eucariotas o procariotas.

20 La invención también proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, método el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un producto según la invención.

25 La invención también proporciona el producto de la invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, particularmente un método para inducir una respuesta inmunitaria.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un producto de la invención en asociación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 La invención proporciona además un método para preparar un suero inmunitario protector para uso en la inmunización pasiva frente a un agente infeccioso, comprendiendo dicho método vacunar a un sujeto animal, incluyendo un ser humano, con un producto de la invención, y recuperar antisuero de dicho animal, incluyendo un ser humano. El antisuero se puede usar entonces en un método de inmunización pasiva de un sujeto. El sujeto puede ser un sujeto con, o en riesgo de, infección con el agente infeccioso.

35 El sujeto animal puede ser particularmente un sujeto mamífero, incluyendo un ser humano. Una ventaja de la presente invención es que, aunque el producto de la invención induce anticuerpos frente al primer componente en mamíferos (tales como ratones y conejos), estos anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con la proteína C4bp mamífera endógena. De este modo, los productos de la invención pueden ser útiles no sólo en uso humano sino también en usos veterinarios, por ejemplo en el tratamiento de mamíferos domesticados, incluyendo ganado (por ejemplo reses, ovejas, cerdos, cabras, caballos) y mascotas (por ejemplo gatos, perros, roedores), o en el tratamiento de mamíferos salvajes, tales como aquellos cautivos en zoológicos.

40 En otro aspecto, el producto de la invención se puede usar para el tratamiento de sujetos no mamíferos, incluyendo aves de corral tales como pollos, pavos, patos, gansos y similares. En este aspecto, el segundo componente puede incluir un antígeno de un organismo infeccioso bacteriano o vírico, tal como un antígeno de una especie *Salmonella*, una especie *Escherichia* (particularmente *E. coli*), una especie *Campylobacter*, un virus de la gripe, o similar.

Más abajo se discuten aquí otros ejemplos de antígenos.

50 Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de ADN y proteica del dominio C4bp de la invención.

55 La figura 2 muestra un alineamiento del dominio C4bp de la invención, el dominio C4bp putativo de CRES y C4bp humana.

La figura 3 es de un gel que muestra una proteína purificada (AVD259) de la invención.

60 La figura 4 muestra el comportamiento de la proteína AVD262 en un gel de SDS-PAGE en presencia y ausencia del agente reductor beta-mercaptoetanol (BME).

Descripción detallada de la invenciónDominio C4bp de SEC ID n°: 1 o su variante

5 El dominio C4bp de SEC ID n°: 1 comprende 62 aminoácidos.

Las variantes de esta proteína son capaces de formar multímeros.

10 La variante tiene al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, por ejemplo al menos 95%, o muy preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de 62 aminoácidos de SEC ID n°: 1.

15 Las variantes de SEC ID n°: 1 incluyen proteínas con una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos. Se prevén particularmente sustituciones, así como supresiones N- y C-terminales. De este modo, preferiblemente, la variante comprenderá una o más de las siguientes:

una supresión N-terminal de 1 a 8, tal como de 1 a 4, restos de aminoácidos;

20 una supresión C-terminal de 1 a 8, tal como de 1 a 4, restos de aminoácidos;

de 1 a 8, tal como 2, 3, 4, 5, 6 o 7 sustituciones de aminoácidos.

Sustituciones de aminoácidos

25 Las sustituciones en las variantes de SEC ID n°: 1 incluyen sustituciones conservativas. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen aquellas en cuanto los grupos de aminoácidos similares, a menudo denominados los grupos Dayhoff. Estos son como siguen:

Grupo 1	D, E, N, Q
Grupo 2	I, L, V, M
Grupo 3	F, Y, W
Grupo 4	K, R, H
Grupo 5	S, P, T, A, G
Grupo 6	C

30 En un aspecto, una variante de SEC ID n°: 1 retiene parte - tal como al menos 3, por ejemplo al menos 6 - o todos los siguientes restos de aminoácidos de SEC ID n°: 1: Cys22; Leu33; Glu34; Lys37; Leu38; Leu40; Glu41; Ile42 y Leu45.

35 De forma deseable, cuando parte o todos de estos restos están presentes, la variante retendrá el espaciamiento relativo entre estos restos.

40 El grado de identidad de secuencia de una variante de SEC ID n°: 1 se puede determinar mediante el algoritmo GAP, parte del "paquete de Wisconsin" de algoritmos usado ampliamente en la técnica y disponible en Accelrys (antiguamente Genetics Computer Group, Madison, WI). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas de manera que se maximice el número de emparejamientos y se minimice el número de saltos. GAP es útil para el alineamiento de secuencias cortas estrechamente relacionadas de longitud similar, y de este modo es adecuado para determinar si una secuencia cumple los niveles de identidad mencionados anteriormente. GAP se puede usar con parámetros de defecto.

45 Los ejemplos de variantes del dominio C4bp que se pueden obtener y ensayar en busca de su capacidad para formar multímeros incluyen las SEC ID n°s: 5 a 14 y las SEC ID n°s 42 y 43, mostradas en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1:

A	B
1	KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLEHILH
5	KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLLEVRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLEHILH
6	KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTEDVKMLLEVRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLEHILH
7	KKQGDADVCGEVIYIQSVVSDCHVPTEDVRTLLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLEHILH
8	KKQGDADVCGEVIYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLEHILH
9	KKQGDADVCGEVIYIQSWSDCHVPTEDVKMLLEIRKLFLEIQKLKVELNGLSKEFLEHILH
10	KKQGDADVCGEVIYIQSVVSDCLPNTEDVKTLLLEVRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLEHILH
11	----DADVCGEVAYIQSVVSDCHVP'IEDVKTLLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEFLE---
12	-----ADVCGEVAYIQSVVSDCHVQTBVDVKTLLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEF-----

13	-----ADVCGEVIYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLLEVRKLFLEIQKLKVELQGLSKEF-----
14	-----ADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLLEIRKLFLEIQKLKVELNGLS-----
42	KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKE-----
43	KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKE-----

A = SEC ID n°; B = secuencia, C = % de identidad (número entero más próximo) calculado con referencia a SEC ID n°: 1.

- 5 Cuando se realizan supresiones de la secuencia, aparte de los truncamientos N- o C-terminales, éstas se limitarán preferiblemente a no más de una, dos o tres supresiones, que pueden ser contiguas o no contiguas.

10 Cuando se realizan inserciones, éstas estarán también deseablemente limitadas en número, de manera que el tamaño de la proteína no supere la longitud de la secuencia de tipo salvaje en más de 20, preferiblemente en no más de 15, más preferiblemente en no más de 10, aminoácidos. De este modo, en el caso de SEC ID n°: 1, la proteína, cuando se modifica mediante inserción, tendrá deseablemente una longitud no mayor que 82 aminoácidos.

15 La capacidad de una variante de SEC ID n°: 1 para formar multímeros se puede ensayar expresando la variante en una célula hospedante procariota como se ilustra en los ejemplos que se acompañan, recuperando la variante, y determinando, por ejemplo mediante filtración en gel, si la variante forma multímeros.

20 En un aspecto alternativo, las variantes del dominio C4bp de SEC ID n°: 1 incluirán otros homólogos no mamíferos de esta secuencia, particularmente homólogos aviares y de reptiles. Como se señala anteriormente, una ventaja del uso de una proteína no mamífera es evitar anticuerpos contra la proteína C4bp nativa del hospedante. Los homólogos se definen como proteínas con signos de un ancestro común, es decir, probablemente son el resultado de una divergencia evolutiva. Los homólogos aviares tendrán generalmente un grado elevado de identidad de secuencia con SEC ID n°: 1, y tales homólogos, así como sus variantes capaces de formar multímeros, también se pueden usar en la presente invención.

25 Los medios para obtener tales homólogos son técnicas habituales disponibles por los expertos en la técnica. En esencia, tales técnicas incluyen usar ácido nucleico que codifica SEC ID n°: 1 de la presente invención, o sus fragmentos, como una sonda para recuperar y determinar la secuencia de homólogos de C4bp en otras especies. Para esto existe una amplia variedad de técnicas, por ejemplo amplificación mediante PCR y clonación del homólogo usando una fuente adecuada de ARNm (por ejemplo, a partir de un embrión o una célula tumoral o diferenciada que se divide activamente), o mediante métodos que comprenden obtener una librería de ADNc del animal, por ejemplo una librería de ADNc de una de las fuentes mencionadas anteriormente, sondear dicha librería con un ácido nucleico que codifica SEC ID n°: 1 en condiciones restrictivas, y recuperar un ADNc que codifica todo o parte del homólogo de SEC ID n°: 1 de ese animal. Cuando se obtiene un ADNc parcial, la secuencia codificante de longitud completa se puede determinar mediante técnicas de extensión con cebadores. Como alternativa, cuando existe toda o parte de la secuencia genómica del animal, se pueden usar búsquedas de homología con SEC ID n°: 1 para determinar homólogos adecuados. En otro aspecto, la invención se refiere a la proteína de SEC ID n°: 1 y su variante que tiene al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, lo más preferible al menos 98% de identidad de secuencia, capaz de formar multímeros como tal. La invención también se refiere a proteínas de fusión de SEC ID n°: 1 y una proteína heteróloga fusionada al término N o C. La proteína heteróloga puede ser una proteína de mamífero.

45 La proteína de SEC ID n°: 1 y su variante, y los productos de la invención, se pueden proporcionar en forma sustancialmente aislada, libre o sustancialmente libre de material con el que está asociada de forma natural, tal como otros polipéptidos con los que se encuentra la célula. La proteína, sus variantes y productos de la invención se pueden formular por supuesto con diluyentes o adyuvantes, y todavía para fines prácticos se puede aislar - por ejemplo, los polipéptidos se mezclarán normalmente con gelatina u otros vehículos si se usan para revestir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos. La proteína, sus variantes y productos de la invención pueden estar glucosilados, ya sea de forma natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas, o pueden estar no glucosilados (por ejemplo si se producen mediante expresión en una célula procariota). La proteína, sus variantes y productos de la invención pueden estar opcionalmente fosforilados y/o acetilados.

50 La proteína, sus variantes y productos de la invención también pueden estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderán generalmente la proteína, variante o producto en una preparación en la que más del 90%, por ejemplo 95%, 98% o 99% de la proteína, variante o producto en la preparación es un polipéptido de la invención.

Otras características del producto

60 El producto de la invención puede comprender, y deseablemente comprenderá, un enlazador flexible entre los componentes primero y segundo. Generalmente, tales enlazadores tienen una longitud de unos pocos aminoácidos, tal como de 1 a 20, por ejemplo de 2 a 10 aminoácidos en longitud. Tales enlazadores son bien conocidos en la técnica, y a menudo consisten en restos seleccionados predominantemente de glicina, serina y alanina. Uno de tales

enlazadores es un enlazador $(\text{Gly}_m\text{-Ser})_n$, en el que m y n son cada uno independientemente de 1 a 4. Estos se usan en la técnica para unir dominios proteicos entre sí. De este modo, el primer componente se puede enlazar al segundo mediante tal enlazador.

- 5 Se prefiere que cuando el primer componente es el dominio C4bp y el producto está en forma de una proteína de fusión, esté en el término C del producto.

10 Cuando el dominio C4bp está en el término N del producto (o el antígeno no se expresa en forma de una fusión con la C4bp), será necesario incorporar una secuencia de aminoácidos adecuada para la expresión de la proteína. Ésta incluirá al menos una metionina N-terminal. Para la expresión bacteriana, el segundo aminoácido (después de Met) es deseablemente alanina. La secuencia N-terminal puede incluir un sitio de escisión para la eliminación química o enzimática de toda o parte de la secuencia. Para productos de la invención en los que el antígeno es C-terminal con respecto al primer componente, tal región N-terminal es deseablemente no mayor de 20, tal como no mayor de 10, aminoácidos.

15 **Antígeno**

Un antígeno es cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor de célula T. Sin embargo, no todos los antígenos son inmunógenos. Un inmunógeno es cualquier sustancia que provoca una respuesta inmunitaria. En un aspecto, la presente invención permite que los antígenos que no son inmunógenos se conviertan en inmunógenos, y aquellos antígenos que son inmunógenos débiles se conviertan en mejores inmunógenos.

25 Una característica importante de la presente invención es que los antígenos monoméricos son muy preferidos cuando los antígenos son producidos al fusionarlos genéticamente a la C4bp, debido a que no impiden el ensamblaje del dominio C4bp en una forma oligomérica, y por lo tanto funcional.

Sin embargo, en un aspecto alternativo, los antígenos pueden ser no monoméricos. Esto puede ser particularmente cuando están acoplados químicamente o no covalentemente al dominio C4bp.

- 30 De este modo, un antígeno monomérico puede caer en dos grupos principales:

- 1) un antígeno que es un fragmento o variante de una proteína progenitora que en su estado natural es multimérica (es decir, dimérica, o un multímero de mayor orden), pero el cual no forma él mismo multímeros en condiciones en las que la proteína progenitora sí forma tales multímeros; y
- 35 2) un antígeno que en su estado natural es un monómero.

Los ejemplos de ambos tipos de antígeno se discuten posteriormente aquí más abajo.

40 Los antígenos monoméricos tienen en común el hecho de que pueden ser codificados en una única pieza de ADN, y cuando este ADN se fusiona a ADN que codifica un dominio C4bp y se traduce subsiguientemente en proteína, el antígeno está enlazado a través de un único punto en el antígeno a una única cadena del dominio C4bp. Un ejemplo simple de tal antígeno sería lisozima de clara de huevo de gallina. El ADNc que codifica el marco de lectura abierto de lisozima de longitud completa se puede fusionar al marco de lectura abierto de C4bp, de tal manera que no esté impedido el ensamblaje de la parte C4bp de la proteína de fusión resultante.

Tras la biosíntesis, una única cadena polipeptídica fusionada a C4bp se puede procesar, por ejemplo mediante proteasas, generando así nuevos términos N y C en la cadena polipeptídica. Si dos o más cadenas generadas mediante escisión proteolítica permanecen unidas entre sí a través de, por ejemplo, enlaces de disulfuro, la proteína de fusión de C4bp tendrá unida a ella, en el extremo del procesamiento, una proteína que normalmente no se consideraría monomérica. Sin embargo, para los fines de esta invención, las proteínas de este tipo son consideradas monoméricas debido a que son codificadas como una única proteína de fusión en un único marco de lectura abierto. Un ejemplo de este tipo sería proinsulina, que se procesa tras la biosíntesis para que tenga dos cadenas, denominadas A y B, que están enlazadas mediante enlaces de disulfuro. Un fragmento de proinsulina, denominado el péptido C, se elimina tras el procesamiento proteolítico de la proteína de fusión precursora.

El antígeno monomérico puede derivar de una proteína que no es necesariamente monomérica en su estado natural. De este modo, muchos antígenos encontrados en un estado polimérico en la naturaleza se pueden modificar, por ejemplo, mediante técnicas de manipulación proteica mediante ingeniería, de manera que se hagan monoméricas. Hay tres ejemplos. Un ejemplo de tal antígeno es el derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe. Ésta es bien conocida por formar una estructura trimérica compleja en su estado natural (Wilson *et al.* Nature 289, 366-373, 1981). Sin embargo, es posible, eliminando el enrollamiento responsable de la trimerización de la molécula, obtener un fragmento monomérico. Un ejemplo específico se proporciona por el trabajo de Jeon y Arnon (Viral Immunology 15, 165-176, 2002). Estos autores usaron solamente los restos 96-261 de la hemaglutinina a fin de tener un fragmento que sólo engloba la región globular de la hemaglutinina.

Otro ejemplo es la proteína 1 de superficie del merozoíto (MSP1) de Plasmodium. Esta gran proteína (aproximadamente 200 kDa) decora la superficie de merozoítos, que son responsables de la etapa sanguínea de las infecciones de malaria. Normalmente se fija a la superficie de merozoítos a través de un anclaje de GPI C-terminal (en el que GPI es glucosilfosfatidilinositol). Este anclaje de GPI va precedido por un tramo hidrófobo de aminoácidos. Como consecuencia de este anclaje, ni la MSP1 de longitud completa ni el fragmento C-terminal, denominado MSP1.19 (que sigue unido a la membrana incluso cuando el merozoíto invade eritrocitos), nunca se encuentran en un estado monomérico en la naturaleza. Lo mismo se aplica a las proteínas de membrana, que tienen una única región transmembránica hidrófoba. La presente invención se practica mejor suprimiendo estos tramos hidrófobos. Véase el ejemplo más abajo, que describe la fusión de proteínas MSP1.19 a dominios C4bp.

De este modo, en un aspecto preferido de la invención, el producto de la invención es una fusión de un fragmento antigénico monomérico de MSP1 de Plasmodium fusionado a un dominio C4bp. El fragmento antigénico de MSP1 de Plasmodium puede comprender de alrededor de 50 a alrededor de 200, preferiblemente de alrededor de 50 a alrededor de 150, aminoácidos. El fragmento antigénico puede proceder de cualquier especie de Plasmodium, tal como Plasmodium falciparum o Plasmodium vivax o Plasmodium ovale o Plasmodium malariae (todos los cuales son capaces de provocar enfermedad en seres humanos) o Plasmodium yoelii.

Aunque las supresiones son el método más fácil para hacer monoméricas a proteínas de otro modo oligoméricas, en algunos casos puede bastar mutar uno o más aminoácidos. Un ejemplo de esto es la proteína Cpn10, que en su estado natural es una proteína heptamérica, como la C4bp en sus isoformas principales. La mutación de un único aminoácido en Cpn10 la convierte en un mutante monomérico que es más adecuado para la fusión a un dominio C4bp (Guidry *et al.* BMC Biochemistry 4, 14-26, 2003). Un enfoque alternativo para monomerizar esta proteína fue suprimir aminoácidos N-terminales o C-terminales (Llorca *et al.* Biochem. Biophysica Acta 1337, 47-56, 1997; Seale y Horowitz, J. Biol. Chem. 270, 30268-30270, 1995) y de ese modo las regiones responsables de la interacción entre subunidades.

En general, para proteína que tendrá una fuerte tendencia a ensamblarse en estructuras oligoméricas (tal como proteínas de cápside vírica), interrumpiendo así el ensamblaje de un dominio C4bp al que está fusionada, se pueden aplicar los principios de suprimir las regiones responsables de la interacción proteína-proteína o de mutar restos en la interfaz, a fin de obtener proteínas monoméricas.

Los antígenos se pueden clasificar en dos categorías, las cuales son adecuadas para uso con la invención. La primera categoría es la de los antígenos exógenos, e incluye todas las moléculas encontradas en organismos infecciosos. Los inmunógenos bacterianos, inmunógenos parasitarios e inmunógenos víricos son útiles como restos polipeptídicos para crear proteínas de fusión de C4bp multiméricas o heteromultiméricas útiles como vacunas.

Las fuentes bacterianas de estos inmunógenos incluyen aquellas responsables de neumonía bacteriana, meningitis, cólera, difteria, tosferina, tétano, tuberculosis y lepra.

Las fuentes parasitarias incluyen parásitos de la malaria, tales como Plasmodium, así como especies de tripanosoma y leishmania.

Las fuentes víricas incluyen poxvirus, por ejemplo virus de la viruela, virus de la viruela vacuna y virus de orf; virus del herpes, por ejemplo virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus B, virus de la varicella zoster, citomegalovirus, y virus de Epstein-Barr; adenovirus, por ejemplo mastadenovirus; papovavirus, por ejemplo papillomavirus tales como HPV16, y polioma virus tales como virus BK y JC; parvovirus, por ejemplo virus adenoasociados; reovirus, por ejemplo reovirus 1, 2 y 3; orbivirus, por ejemplo fiebre de la garrapata del Colorado; rotavirus, por ejemplo rotavirus humanos; alfavirus, por ejemplo virus de la encefalitis oriental y virus de la encefalitis venezolana; rubivirus, por ejemplo rubéola; flavivirus, por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis portado por garrapatas y virus de la hepatitis C; coronavirus, por ejemplo coronavirus humanos; paramixovirus, por ejemplo parainfluenza 1, 2, 3 y 4 y paperas; morbilivirus, por ejemplo virus del sarampión; pneumovirus, por ejemplo virus sincitial respiratorio; vesiculovirus, por ejemplo virus de la estomatitis vesicular; lisavirus, por ejemplo virus de la rabia; ortomixovirus, por ejemplo gripe A y B; bunyavirus, por ejemplo virus de La Crosse; flebovirus, por ejemplo virus de la fiebre del Valle del Rift; nairovirus, por ejemplo virus de la fiebre hemorrágica del Congo; hepadnaviridae, por ejemplo hepatitis B; arenavirus, por ejemplo virus 1cm, virus de Lassa y virus Junín; retrovirus, por ejemplo HTLV I, HTLV II, HIV-1 y HIV-2; enterovirus, por ejemplo virus 1, 2 y 3 de la polio, virus Cocksackie, ecovirus, enterovirus humanos, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, y virus de Norwalk; rinovirus, por ejemplo rinovirus humano; y filoviridae, por ejemplo virus de (la enfermedad de) Marburg y virus del ébola.

Los antígenos procedentes de estas fuentes bacterianas, víricas y parasitarias se pueden usar en la producción de proteínas multiméricas útiles como vacunas. Los multímeros pueden comprender una mezcla de monómeros que poseen diferentes antígenos.

Los antígenos de estas fuentes bacterianas, víricas y parasitarias se pueden considerar como antígenos exógenos debido a que no están presentes normalmente en el hospedante y no son codificados en el genoma del hospedante.

Los antígenos endógenos, por el contrario, están normalmente presentes en el hospedante o son codificados en el genoma del hospedante, o ambos. La capacidad para generar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno endógeno es útil para tratar tumores que poseen ese antígeno, o para neutralizar factores de crecimiento para el tumor. Un ejemplo del primer tipo de antígeno endógeno es HER2, la diana para el anticuerpo monoclonal denominado herceptina. Un ejemplo del segundo tipo de antígeno endógeno, de factor de crecimiento, es la hormona liberadora de gonadotropina (denominada GnRH), que tiene un efecto trófico sobre algunos carcinomas de la glándula prostática.

Por lo tanto, los productos de la presente invención se pueden usar, solos o en combinación con otro tratamiento antitumoral, por ejemplo quimioterapia, para el tratamiento o prevención de cáncer.

Por ejemplo, el tratamiento puede provocar una reducción en la tasa o cantidad de crecimiento de un tumor. El tratamiento también incluye reducir o mejorar los síntomas indeseables de cáncer.

Los tratamientos antitumorales actuales incluyen, por ejemplo, quimioterapia (CT), terapia de radiación (RT) y cirugía, y sus combinaciones, así como tratamientos especializados tales como el uso de inhibidores de la angiogénesis, terapias biológicas, incluyendo terapia adyuvante para estimular el sistema inmunitario del paciente, terapia de anticuerpos, terapia de vacunas, y terapia fotodinámica.

La “quimioterapia” (CT) se refiere al tratamiento con fármacos contra el cáncer. El término engloba numerosas clases de agentes, incluyendo fármacos a base de platino, agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antimitóticos, agentes antimicrotubulares, alcaloides vegetales, y antibióticos antitumorales, inhibidores de cinasas, inhibidores de proteasoma, inhibidores de EGFR, inhibidores de la dimerización de HER, inhibidores de VEGF, y moléculas antisentido, e incluye anticuerpos. Tales fármacos incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, melfalán, ara-C, BiCNU, busulfano, CCNU, pentostatina, los fármacos a base de platino carboplatino, cisplatino y oxaliplatino, ciclofosfamida, daunorrubicina, epirubicina, dacarbazina, 5-fluorouracilo (5-FU), fludarabina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, metotrexato, altretamina, mitramicina, mitomicina, bleomicina, clorambucilo, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, mercaptopurina, mitozantrona, paclitaxel (Taxol®), vinblastina, vincristina, vindesina, etopósido, gemcitabina, anticuerpos monoclonales tales como Herceptin®, Rituxan®, Campath®, Zevelin® y Bexxar®, irinotecán, leustatina, vinorelbina, STI-571 (Gleevec®), tamoxifeno, docetaxel, topotecán, capecetabina (xeloda®), raltitrexed, estreptozocina, tegafur con uracilo, temozolomida, tioguanina, tiotepa, podofilotoxina, filgristim, profimer sódico, letrozol, amifostina, anastrozol, temozolomida, trióxido de arsénico, epitalonas A y B, tretinoina, interleucinas (por ejemplo 2 y 12) e interferones, por ejemplo alfa y gamma, bortezomib, huBr-E3, Genasense, Ganite, ligando FIT-3, MLN491RL, MLN2704, MLN576, y MLN518. Los agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, BMS-275291, Dalteparina (Fragmin®), 2-metoxiestradiol (2-ME), talidomida, CC-5013 (análogo de talidomida), maspina, fosfato de combretastatina A4, LY317615, isoflavona de soja (genisteína; aislado proteico de soja), AE-941 (Neovastat™; GW786034), anticuerpo anti-VEGF (Bevacizumab; Avastin™), PTK787/ZK 222584, VEGF-trap, ZD6474, EMD 121974, anticuerpo anti-integrina $\alpha_5\beta_1$ (Medi-522; Vitaxin™), carboxiamidotriazol (CAI), celecoxib (Celebrex®), hidrobromuro de halofuginona (Tempostat™), y Rofecoxib (VIOXX®).

El término “quimioterapia” también incluye terapia génica con agentes tales como interferón y las interleucinas, es decir, la administración de un vector que codifica genes para los interferones o interleucinas. Véase, por ejemplo, Heller *et al.*, Technol Cancer Res Treat. 2002; 1 (3): 205-9.

Los inmunógenos obtenidos usando la presente invención se pueden usar con fines de investigación o terapéuticos. Por ejemplo, las aplicaciones de investigación incluyen la generación de antisueros para productos génicos predichos en datos de secuencias genómicas. Este requisito se aplica a productos génicos procariotas, tales como bacterianos, y eucariotas, incluyendo fúngicos y de mamíferos. El antígeno puede tener cualquier tamaño convencional en la técnica para vacunas, oscilando desde péptidos cortos hasta proteínas muy grandes.

Los inmunógenos no polipeptídicos pueden ser, por ejemplo, hidratos de carbono o ácidos nucleicos. Los revestimientos de polisacáridos de las especies *Neisseria* o de la especie *Streptococcus pneumoniae* son ejemplos de hidratos de carbono que se pueden usar para los fines de la invención.

Cuando un inmunógeno no polipeptídico es parte del producto de la invención, el inmunógeno se puede unir covalentemente al primer componente del producto usando métodos sintéticos habituales. Generalmente, el inmunógeno se puede unir al término N o C de un dominio C4bp o variante del mismo que comprende el primer componente, o a un grupo de cadena lateral de aminoácido (por ejemplo, el grupo amino en épsilon de lisina o el grupo tiol de cisteína), o una combinación de los mismos. Se puede añadir más de un inmunógeno por proteína de fusión. Para facilitar el acoplamiento, se puede añadir un resto de cisteína al dominio C4bp o variante del mismo, por ejemplo como el término N o C.

La presente invención tiene muchas ventajas en la generación de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el uso de multímeros puede permitir la presentación de un número de antígenos, simultáneamente, al sistema inmunitario. Esto permite la preparación de vacunas polivalentes, capaces de producir una respuesta inmunitaria frente a más de un epítipo, que puede estar presente en un único organismo o un número de diferentes organismos.

En consecuencia, en un aspecto adicional, el antígeno monomérico puede ser un antígeno sintético que comprende dos epítomos diferentes, ya sea de dos organismos diferentes o de dos proteínas diferentes del mismo organismo. Un ejemplo de esto último es una fusión de una secuencia de antígeno de esporozoíto, por ejemplo dos o más secuencias de la repetición de NANP de la proteína del circumsporozoíto, unida a una secuencia de MSP1. Un segundo ejemplo de esto último es una fusión de la secuencia de M2e, descrita por Neirynck *et al.* (Nature Medicine 5, 1157- 1163, 1999), fusionada a un fragmento de hemaglutinina de la gripe monomérica.

De este modo, las vacunas formadas según la invención se pueden usar para la vacunación simultánea contra más de una enfermedad, o para seleccionar como dianas simultáneamente a una pluralidad de epítomos de un patógeno dado. Los epítomos pueden estar presentes en unidades monoméricas individuales o en diferentes unidades monoméricas que se combinan para proporcionar un heteromultímero.

Ácidos nucleicos

Los dominios C4bp y los productos de la invención que comprenden tales dominios (que incluyen en ambos casos variantes de los mismos) se pueden producir mediante expresión de una proteína de fusión en una célula hospedante procariota o eucariota, usando un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína. Cuando el antígeno es un polipéptido, se puede usar la expresión de la proteína de fusión a partir de una secuencia de ácido nucleico para producir un producto de la invención.

De este modo, la invención proporciona un constructo de ácido nucleico, generalmente ADN o ARN, que codifica una proteína de la invención.

El constructo estará generalmente en forma de un vector replicable, en el cual la secuencia que codifica la proteína está enlazada funcionalmente a un promotor adecuado para la expresión de la proteína en una célula hospedante deseada.

Los vectores se pueden proporcionar con un origen de replicación y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables. Hay una amplia variedad de vectores de expresión procariotas y eucariotas conocidos como tales en la técnica, y la presente invención puede utilizar cualquier vector según las preferencias individuales de aquellos de pericia en la técnica.

En el método de la presente invención se puede usar una amplia variedad de células hospedantes procariotas. Estos hospedantes pueden incluir cepas de *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Thermophilus*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* o *Streptomyces*. Por ejemplo, si en el método de la invención se usa *E. coli* del género *Escherichia*, las cepas preferidas de esta bacteria a usar incluirían derivados de BL21 (DE3) incluyendo C41 (DE3), C43 (DE3) o CO214 (DE3), como se describe y está disponible en el documento WO98/02559.

Incluso más preferiblemente, los derivados de estas cepas que carecen del profago DE3 se pueden usar cuando el promotor no es el promotor T7.

Los vectores procariotas incluyen plásmidos bacterianos, por ejemplo plásmidos derivados de *E. coli*, incluyendo ColEI, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de un intervalo más amplio de hospedantes, por ejemplo RP4; ADN de fagos, por ejemplo los numerosos derivados del fago lambda, por ejemplo NM989, y los otros fagos de ADN, por ejemplo M13 y los fagos de ADN monocatenarios filamentosos. Estos y otros vectores se pueden manipular usando metodología de ADN recombinante estándar para introducir un ácido nucleico de la invención enlazado funcionalmente a un promotor.

El promotor puede ser un promotor inducible. Los promotores adecuados incluyen el promotor T7, el promotor tac, el promotor trp, los promotores lambda P_L o P_R, y otros bien conocidos por los expertos en la técnica.

También se puede usar una amplia variedad de células hospedantes eucariotas, incluyendo, por ejemplo, células de levadura, de insectos y de mamíferos. Las células de mamífero incluyen células de CHO y células de ratón, células del mono gris africano, tales como COS-1, y células humanas.

Se conocen muchos vectores eucariotas adecuados para la expresión de proteínas. Estos vectores se pueden diseñar para incorporarlos cromosómicamente en un genoma de célula eucariota, o para ser mantenidos extracromosómicamente, o para ser mantenidos sólo transitoriamente en células eucariotas. El ácido nucleico puede estar enlazado funcionalmente a un promotor adecuado, tal como un promotor vírico fuerte que incluye un promotor del CMV, un promotor del antígeno T del SV40, o una LTR retroviral.

Para obtener un producto de la invención, las células hospedantes que poseen un vector de la invención se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína, y la proteína se puede recuperar de las células del medio de cultivo.

Cultivo de las células

Los plásmidos que codifican proteínas de fusión según la invención se pueden introducir en las células hospedantes usando técnicas de transformación convencionales, y las células se pueden cultivar en condiciones para facilitar la producción de la proteína de fusión. Cuando se usa un promotor inducible, las células se pueden cultivar inicialmente en ausencia del inductor, que entonces se puede añadir una vez que las células están creciendo a una mayor densidad, a fin de maximizar la recuperación de la proteína.

Las condiciones de cultivo celular son ampliamente conocidas en la técnica, y se pueden usar según procedimientos conocidos como tales.

Aunque el documento WO 91/11461 sugiere que las células hospedantes procariotas se pueden usar en la producción de proteínas a base de C4bp, no hay ninguna demostración experimental de tal producción.

Recientemente, se ha encontrado que las proteínas fusionadas a la C4bp producida en los sistemas de expresión procariotas retienen su actividad funcional. Esto se describe en el documento WO 2004/020639, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. Tales métodos se pueden usar en la producción de proteínas de fusión de la presente invención.

Recuperación de proteína a partir de cultivo

Una vez que las células se han hecho crecer para permitir la producción de la proteína, la proteína se puede recuperar de las células. Debido a que se ha encontrado que, sorprendentemente, la proteína permanece soluble, las células habitualmente se harán girar y se lisarán mediante ultrasonidos, por ejemplo, que mantiene soluble a la fracción proteica y permite que esta fracción permanezca en el sobrenadante tras una centrifugación posterior a mayor velocidad (por ejemplo 15.000 rpm durante 1 hora).

Sorprendentemente, también se ha encontrado que el truncamiento y/o variación del dominio C4bp puede afectar a la solubilidad de la proteína de fusión. El truncamiento puede ser en el término C o N. En particular, un truncamiento C-terminal puede mejorar la solubilidad de la proteína de fusión. Por ejemplo, el ejemplo 11 muestra que la supresión de los últimos siete aminoácidos C-terminales del dominio C4bp, como se muestra en SEC ID n°: 1, mejora la solubilidad de la proteína de fusión.

La proteína de fusión en la fracción proteica del sobrenadante se puede purificar posteriormente mediante cualquier combinación adecuada de técnicas de cromatografía de proteínas estándar. Se usó cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad.

Dependiendo de los usos pretendidos de la proteína, la proteína se puede someter a etapas posteriores de purificación, por ejemplo diálisis, o a etapas de concentración, por ejemplo liofilización.

Se ha encontrado que el término C del dominio C4bp, como se muestra en SEC ID n°: 1 (o su variante), facilita la purificación de la proteína de fusión. En particular, se ha encontrado que el término C puede mejorar la unión de una proteína de fusión a una matriz de purificación, tal como una columna de purificación, por ejemplo una columna de cromatografía de afinidad de níquel. Por ejemplo, se ha demostrado en el Ejemplo 11 que los últimos siete aminoácidos C-terminales del dominio C4bp de SEC ID n°: 1 (FLEHILH) facilitan la unión de una proteína de fusión a una columna de afinidad de níquel.

Los últimos siete aminoácidos C-terminales comprenden sólo dos histidinas. Mientras se sabe que las etiquetas de hexahistidina ampliamente usadas (también denominadas etiqueta de polihistidina), que comprenden seis histidinas consecutivas, muestran una elevada afinidad por columnas de níquel, se muestra - se cree por primera vez - que dos histidinas son suficientes para permitir la unión. Las dos histidinas se pueden separar adicionalmente por un número de aminoácidos intermedios. Puede haber uno, dos o más aminoácidos intermedios.

Por lo tanto, se puede prever que el término C de SEC ID n°: 1, o su variante, se puede usar como una etiqueta de purificación. Se puede unir a otra proteína, por ejemplo mediante fusión, para facilitar la purificación de dicha proteína. Se puede unir en cualquier posición de una proteína. Se puede unir al término N o al término C. En particular, la secuencia FLEHILH (SEC ID n°:44), o una variante de la misma, se podría usar como una etiqueta de purificación para otras proteínas.

Las variantes de FLEHILH incluyen polipéptidos con una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos. Las variantes son capaces de unirse a una columna de cromatografía de afinidad de níquel. Una variante puede tener dos histidinas separadas por uno, dos, tres, cuatro o más aminoácidos intermedios.

Composiciones y sus usos

Las proteínas y productos según la invención se pueden preparar en forma de una composición farmacéutica. El

producto estará presente con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La composición se preparará según el uso pretendido y vía de administración del producto. De este modo, la invención proporciona una composición que comprende un producto de la invención en forma multimérica junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y el uso de tal composición en métodos de inmunoterapia para el tratamiento o profilaxis de un sujeto humano o animal.

Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen aquellos usados en formulaciones adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, y se pueden preparar por cualquier de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., una proteína de fusión de la invención con adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similar, para formar de ese modo una disolución o suspensión. Si se desea, la composición a administrar también puede contener sustancias auxiliares, tales como agentes tamponantes del pH, y similares. Los métodos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán manifiestos, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19ª Edición, 1995.

Las composiciones según la invención pueden comprender adicionalmente uno o más adyuvantes, por ejemplo sales minerales tales como hidróxido de aluminio o fosfato de calcio, o citocinas tales como IL-12 o GM-CSF. Se da una lista más completa de adyuvantes adecuados en la Tabla 1 de Singh y O'Hagan, Nature Biotechnology, 17, 1075-1081, 1999, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

Los productos según la invención, deseablemente en forma de una composición o formulación, se pueden usar en métodos de tratamiento como se describen aquí, mediante administración del producto o su composición a un sujeto humano o animal. La cantidad eficaz para aliviar los síntomas del sujeto que se está tratando se determinará por el médico teniendo en cuenta el paciente y el estado a tratar. Se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,25 a 95%, estando constituido el resto por vehículo no tóxico.

La administración parenteral se caracteriza generalmente por inyección, ya sea subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similar. Un enfoque ideado más recientemente para la administración parenteral emplea la implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel constante de dosis. Véase, por ejemplo, la patente US nº 3.710.795.

Las dosis del producto dependerán de la naturaleza del antígeno, y se pueden determinar según la práctica actual para la administración de ese antígeno en formulaciones de vacuna convencionales.

Inmunización pasiva

En un aspecto adicional, la invención proporciona un medio para la inmunización pasiva de un sujeto con un suero inmunitario que contiene anticuerpos obtenidos mediante vacunación de un sujeto hospedante con un producto de la invención. El sujeto hospedante puede ser un ser humano o mamífero no humano. De este modo, en un aspecto adicional, la invención proporciona un suero inmunitario obtenido mediante tal método, y el uso de tal suero inmunitario en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.

Vacunas de ADN

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de expresión eucariota que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto de proteína de fusión recombinante de la invención para uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal.

Tal tratamiento lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno con el fin de provocar una respuesta inmunitaria. El suministro de ácidos nucleicos se puede lograr usando un vector plasmídico (en forma "desnuda" o formulada) o un vector de expresión recombinante. Para un repaso de la vacunación de ADN, véase Ada G. y Ramshaw I, en Expert Opinion in Emerging Drugs 8, 27-35, 2003).

Los diversos vectores víricos que se pueden utilizar para el suministro génico incluyen adenovirus, virus del herpes, virus de la vacuna o un virus de ARN, tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovíricos en los que se puede insertar un único gen extraño

incluyen, pero no se limitan a: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus de tumor mamario murino (MuMTV), y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Cuando el sujeto es un ser humano, se puede utilizar un vector tal como el virus de la leucemia del mono babuino (GaLV).

El vector incluirá una secuencia reguladora transcripcional, particularmente una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis del ARN. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer *et al.*, 1982, J. Molec. Appl. Genet. 1: 273); el promotor TK del virus del herpes (McKnight, 1982, Cell 31: 355); el promotor temprano del SV40 (Benoist *et al.*, 1981, Nature 290: 304); el promotor del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777); y el promotor de citomegalovirus (Foecking *et al.*, 1980, Gene 45: 101).

La administración de vectores de este aspecto de la invención a un sujeto, ya sea como un vector plasmídico o como parte de un vector vírico, se puede efectuar por muchas rutas diferentes. El ADN plasmídico puede estar "desnudo" o se puede formular con lípidos catiónicos y neutros (liposomas), o se puede microencapsular para el suministro directo o indirecto. Las secuencias de ADN también pueden estar contenidas en un vector vírico (por ejemplo, adenovírico, retrovírico, virus del herpes, virus de la viruela), que se puede usar para el suministro directo o indirecto. Las rutas de suministro incluyen, pero no se limitan a, oral, intramuscular, intradérmica (Sato, Y. *et al.*, 1996, Science 273: 352-354), intravenosa, intra-arterial, intratecal, intrahepática, por inhalación, instilación intravaginal (Bagarazzi *et al.*, 1997, J Med. Primatol. 26:27), intrarrectal, intratumoral o intraperitoneal.

De este modo, la invención incluye un vector como se describe aquí como una composición farmacéutica útil para permitir la transfección de algunas células con el vector de ADN, de tal manera que se expresará un polipéptido terapéutico y tendrá un efecto terapéutico, a saber, para inducir una respuesta inmunitaria frente a un antígeno. Las composiciones farmacéuticas según la invención se preparan presentando el constructo según la presente invención en una forma adecuada para la administración a un sujeto usando disolventes, vehículos, sistemas de suministro, excipientes, y aditivos o auxiliares. Los disolventes usados frecuentemente incluyen agua estéril y disolución salina (tamponada o no). Un vehículo incluye partículas de oro, que se suministran biolísticamente (es decir, bajo presión de gas). Otros vehículos o sistemas de suministro usados frecuentemente incluyen liposomas catiónicos, cocleatos y microcápsulas, que se pueden administrar como una disolución líquida, encerrada en una cápsula de suministro o incorporada en alimento.

Una formulación alternativa para la administración de vectores de suministro génico implica liposomas. El encapsulamiento en liposomas proporciona una formulación alternativa para la administración de polinucleótidos y vectores de expresión. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean a compartimientos acuosos. Véanse, generalmente, Bakker-Woudenberg *et al.*, 1993, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1): S61, y Kim, 1993, Drugs 46: 618. Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares, y, como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y los liposomas pueden variar en tamaño, con diámetros que oscilan desde 0,02 μm a más de 10 μm . Véanse, por ejemplo, Machy *et al.*, 1987, LIPOSOMES IN CELL BIOLOGY AND PHARMACOLOGY (John Libbey), y Ostro *et al.*, 1989, American J. Hosp. Phann. 46: 1576.

Los vectores de expresión se pueden encapsular en liposomas usando técnicas estándar. Los expertos en la técnica conocen una variedad de diferentes composiciones liposómicas y métodos para la síntesis. Véanse, por ejemplo, los documentos US-A-4.844.904, US-A-5.000.959, US-A-4.863.740, US-A-5.589.466, US-A-5.580.859, y US-A-4.975.282, todos los cuales se incorporan aquí como referencia.

En general, la dosis de vectores administrados encapsulados en liposomas variará dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, estado médico general e historia médica previa del paciente. Los intervalos de dosis para formulaciones particulares se pueden determinar usando un modelo de animal adecuado.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Clonación y expresión del dominio de oligomerización C4bp de pollo

El fragmento de ADN que codifica el dominio de oligomerización C4bp de pollo se amplificó a partir de ADN genómico de pollo usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos (los sitios de restricción están subrayados):

oAVD469: 5' GGGGGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGG 3' (SEC ID n°: 15) y
oAVD470: 5' GGGGGAATTCTTATTAGTGCAGAATGTGCTCCAGGAACTC 3' (SEC ID n°: 16)

y se clonó, como un fragmento BamHI/EcoRI, en dirección 3' de una secuencia potenciadora de la traducción y el promotor T7 en un vector plasmídico, creando así el plásmido pAVD259. SEC ID n°: 17 muestra la secuencia de la proteína, AVD259, expresada a partir de este plásmido, y SEC ID n°: 18 muestra la secuencia nucleotídica que la codifica:

SEC ID nº: 17: la proteína AVD259

MALKKHHENE ISHHGSKKQG DADVCGEVAY IQSVVSDCHV PTEDVKTLLE IRKLFLEIQK LKVELQGLSK
EFLEHILH

SEC ID nº: 18: secuencia de ADN que codifica la proteína AVD259

ATGGCCTTGAAGAAACACCATGAAAATGAGATCTCTCATCATGGATCCAA
GAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTAGAGCG
TCGTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGAGGACGTGAAAACCTCTGCTGGAA
ATACGAAAACCTCTTCTGGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGGAATTGCAAGG
ACTGAGCAAGGAGTTCCTGGAGCACATTCTGCACTAA

Ejemplo 2: Purificación y caracterización de la proteína AVD259

Expresión

El plásmido pAVD259 que codifica el dominio de oligomerización C4bp de pollo se expresó en la cepa C41 (DE3) de *E. coli*. Las células transformadas se hicieron crecer en medio LB a 37°C hasta una OD600 de aproximadamente 0,6, después se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 0,5 mM, y el cultivo se hizo crecer durante otras cuatro horas a 37°C, en cuyo momento las células se cosecharon mediante centrifugación.

Purificación de la proteína AVD259

La proteína AVD259 se purificó a partir de 1 litro de células C41(DE3). Toda la proteína se encontró en la fracción soluble después de que las células se lisaron mediante ultrasonidos en un tampón que contiene 20 mM de Tris, pH 8,0. El sobrenadante, tras la centrifugación, se cargó en una columna de afinidad de níquel.

Purificación en columna de afinidad

La columna se equilibró en 20 mM de Tris pH 8,0 (tampón A). La proteína se eluyó con tampón B (tampón A más 300 mM de NaCl y 300 mM de imidazol).

Columna de filtración en gel (Superdex 200 26/60 grado prep)

Una columna Superdex 200 26/60 se equilibró con 20 mM de tampón Tris pH 8, y se cargó la proteína AVD259 concentrada procedente de la columna de afinidad. La proteína eluyó en un volumen de 200 ml.

Caracterización biofísica

El estado oligomérico de las proteínas de fusión del dominio de oligomerización C4bp se puede comprobar fácilmente comparando el comportamiento de la proteína en un gel SDS-PAGE en presencia y ausencia del agente reductor beta-mercaptoetanol (BME).

La figura 3 muestra el comportamiento de proteína AVD259 recientemente purificada. La proteína se purificó rápidamente (en menos de 48 horas), y de este modo la formación de enlaces de disulfuro, que se produce espontáneamente al exponerla al aire, es incompleta. (Los enlaces de disulfuro no se pueden formar en el entorno reductor del citosol bacteriano). Cada línea 1 contiene 3 µg, cada línea 2 contiene 5 µg, y cada línea 3 contiene 8 µg. En presencia de beta-mercaptoetanol (designado +βme), la proteína corre exclusivamente como monómero, con un tamaño aparente de aproximadamente 8 kDa. En ausencia de beta-mercaptoetanol (designado -βme), se puede observar claramente bandas de monómero, de dímero, de trímero, de tetramero, de pentámero, de hexámero y de heptámero.

Ejemplo 3: Expresión de la proteína de fusión de MSP1.19 de Plasmodium yoelii-C4bp de pollo (AVD262)

Para determinar el efecto de la fusión del dominio de oligomerización C4bp de pollo a un antígeno, se fusionó a aquél el antígeno MSP1.19 de Plasmodium yoelii. Esto se logró sustituyendo el fragmento BamHI-EcoRI que codifica C4bp murina en el plásmido pAVD108 por un fragmento BamHI-EcoRI procedente de pAVD259 (descrito en el Ejemplo 1), creando así el plásmido pAVD262. El plásmido pAVD108 se ha descrito previamente en el Ejemplo 4 del documento PCT/IB2004/002717. La proteína de fusión, denominada AVD262, se expresó en y se purificó a partir de la cepa bacteriana C41(DE3). La proteína de fusión purificada se usó para inmunizar ratones, conejos y pollos sin la adición de ningún adyuvante.

La secuencia nucleotídica que codifica la proteína de fusión AVD262 es SEC ID n°: 19 según lo siguiente:

```
atgagatctcacattgcctctattgctttgaacaactgaacaagtctgg
tttggtaggagaagggtgagtcctaagaagattttggctaagatgctgaaca
tggaoggtatggacttgggtgggtgacccctaagcatgtttgtgttgac
actagagacattcctaagaacgctggatgtttcagagacgacaacgggtac
tgaagagtgaggatgtttgttgggttacaagaagggtgagggtaacacct
gcggttgagaacaacaacccctacttgcgacatcaacaacgggtggatgtgac
ccaacgcctcttgtcaaaacgctgaatctaccgaaaactccaagaagat
tatttgcacctgtaaggaaccaacccctaacgcctactacgagggtgttt
tctgttcttcttccGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGA
GAGGTTGCTTATATTGAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGA
GGACGTGAAAACCTCTGCTGGAAATACGAAAACCTCTTCTGGAGATTCAAA
AACTGAAGGTGGAATTGCAAGGACTGAGCAAGGAGTTCTTGGAGCACATT
CTGCACTAA
```

- 5 La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AVD262 codificada por este constructo es SEC ID n°: 20, según lo siguiente:

```
MRSHIASIAL NNLNKSGLVG RGESKKILAK MLNMDGMDLL GVDPKHVCVD
TRDIPKNAGC FRDDNGTEEW RCLLGYKKGE GNTCVENNNP TCDINNGGCD
PTASCQNAES TENSKKIICT CKEPTPNAYY EGVFCSSSGS KKQGDADVCG
EVAYIQSVVS DCHVPTEDVK TLEIRKLFL EIQKLKVELQ GLSKEFLEHI LH
```

- 10 Los restos 4-138 de esta secuencia corresponden a los restos 1619-1753 de MSP1 de Plasmodium yoelii, y los restos 141-202 de esta secuencia corresponden a los 62 restos del dominio de oligomerización C4bp de pollo. Entre los dos componentes aparece una secuencia ligadora GS.

Expresión

- 15 El plásmido pAVD262, que codifica Plasmodium yoelii-dominio de oligomerización C4bp de pollo, se expresó en la cepa C41(DE3) de *E. coli*. Las células transformadas se hicieron crecer en medio LB a 37°C hasta una OD600 de aproximadamente 0,6, entonces se indujo la expresión con IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM, y el cultivo se hizo crecer durante otras cuatro horas a 37°C, en cuyo momento las células se cosecharon mediante centrifugación.

Purificación de la proteína de fusión AVD262

- 25 La proteína AVD262 se purificó a partir de 1 litro de células C41(DE3). Toda la proteína de fusión se encontró en la fracción soluble después de que las células se lisaron mediante ultrasonidos en un tampón que contiene 20 mM de MES pH 6,5, 5 mM de EDTA y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). El sobrenadante, tras la centrifugación, se cargó en una columna HitrapS.

Columna catiónica (HiTrap S)

- 30 La columna se equilibró en tampón de 20 mM de MES pH 6,5, 5 mM de EDTA (tampón A). La proteína se eluyó con un gradiente de 10 volúmenes de columna desde el Tampón A hasta el Tampón B (tampón A más NaCl 1M). Las fracciones de HiTrapS que contienen AVD262 se concentraron usando un concentrador Millipore (corte 30 K), y después se cargaron en una columna de filtración en gel, tras la desnaturalización durante toda la noche en un volumen final de 10 ml en un tampón que contiene 50 mM de Tris pH 8 y 8 M de urea.

Primera columna de filtración en gel (Superdex 200 26/60 grado prep) en presencia de urea

- 40 Una columna Superdex 200 26/60 se equilibró con 20 mM de tampón Tris pH 8, 150 mM de NaCl y 8M de urea, y se cargó la proteína AVD262 concentrada procedente de las fracciones de HiTrapS. La proteína eluyó en un volumen de 186 ml, que se cargó sobre una segunda columna Superdex 200 26/60, equilibrada en PBS.

Segunda columna de filtración en gel (Superdex 200 26/60 grado prep)

Se cargó la proteína AVD262 concentrada procedente de la primera columna Superdex 200 26/60. La proteína, ya no desnaturalizada, eluyó en un volumen de 164 ml, como lo hace la proteína AVD108.

Caracterización biofísica

El estado oligomérico de la proteína AVD262 se comprobó comparando su comportamiento en un gel de SDS-PAGE en presencia y ausencia del agente reductor beta-mercaptoetanol (BME). Como muestra la figura 4, la proteína AVD262 tiene un tamaño aparente de aproximadamente 140 kDa en ausencia de BME (los enlaces de disulfuro intrasubunitarios se han formado tras la exposición a aire), mientras que, en presencia de BME, se redujo y corre con un tamaño aparente de justo alrededor de 20 kDa (ya que los enlaces de disulfuro son incapaces de formarse en el entorno reductor del citosol bacteriano). En la figura 4, cada línea 1 contiene 2,5 µg de proteína purificada, y cada línea 2 contiene 5 µg. Se puede observar claramente que, en presencia de BME (en las líneas, designado +βme), la proteína migra como un monómero con un tamaño aparente de justo alrededor de 20 kDa. En ausencia de beta-mercaptoetanol (designado -βme) la proteína corre como un heptámero de aproximadamente 140 kDa.

Ejemplo 4: Inmunización de ratones

La proteína AVD262 purificada se usó para inmunizar tres ratones BALB/c. No se usó adyuvante, y la proteína estaba en una disolución salina isotónica tamponada. Se usaron cuarenta microgramos (2 nanomoles) de proteína por inyección. A cada ratón se le inyectó dos veces, subcutáneamente, a intervalos de cuatro semanas (en otras palabras, en los días 0 y 29).

Se inmunizaron tres ratones BALB/C con cuarenta microgramos (también 2 nanomoles) de la proteína AVD108, que es la misma que AVD262 pero con los 54 aminoácidos C-terminales de C4bp murino. A cada ratón se le inyectó dos veces, subcutáneamente, en los días 0 y 29. Finalmente, tres ratones recibieron 40 microgramos de AVD108 en adyuvante de Freund (completo para la primera inyección en el día 0, seguido de incompleto para la segunda inyección en el día 29). Todos los ratones se sangraron en el día 43, y se midieron sus títulos de anticuerpos contra el antígeno de Plasmodium yoelii recombinante.

Los ratones a los que se les inyectó con AVD108 sola tuvieron títulos de anticuerpos de 25.600 o 51.200. Aquellos que recibieron proteína AVD108 con adyuvante de Freund tuvieron títulos de anticuerpos de 102.400, como los tuvieron aquellos que recibieron la proteína AVD262 sin adyuvante.

Ejemplo 5: Inmunización de conejos

La proteína AVD262 purificada se usó para inmunizar tres conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW). El calendario de inmunización fue el siguiente: cada conejo recibió tres inyecciones a intervalos de dos semanas (en otras palabras, en los días 0, 14, y 28). Cada inyección fue subcutánea y contenía 100 microgramos (o 4,5 nanomoles) de proteína en una disolución salina isotónica tamponada sin la adición de ningún adyuvante conocido.

Paralelamente, se inmunizaron tres conejos NZW, según el mismo calendario, con 20 nanomoles de proteína AVD263. La proteína AVD263 es la misma que AVD262, pero el dominio de oligomerización C4bp de C4bp de conejo sustituye a la oligomerización C4bp de pollo. Tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 21 según lo siguiente:

```
MRSHIASIALNNLNKSGLVGEGESKKILAKMLNMDGMDLLGVDPKHVCVDTRDIPKNAGCFRDD
NGTEEWRCLLGYKKGEGNTCVENNNPTCDINNGGCDPTASCQNAESTENSKKI ICTCKEPTPNA
YYEGVFCSSSGSEVPEGCEQVQAGRRLMQCLADPYEVKMALEVYKLSLEIELLELQRDKARKSS
VLRQL
```

Se extrajo sangre de cada animal en el día 35, y los títulos de anticuerpos frente al antígeno de Plasmodium yoelii recombinante se midieron mediante ELISA. Los resultados fueron los siguientes:

Los conejos que recibieron la proteína AVD262 tuvieron títulos de anticuerpos de 25.600, mientras que los conejos que recibieron la proteína AVD263 tuvieron títulos de anticuerpos de 6.400. Esto es particularmente llamativo, ya que la cantidad de proteína AVD262 usada fue menor que la cantidad de proteína AVD263 inyectada.

Ejemplo 6: Inmunización de pollos

La proteína AVD262 purificada se usó para inmunizar tres pollos. El calendario de inmunización fue el siguiente: cada pollo recibió tres inyecciones a intervalos de diez días (en otras palabras, en los días 0, 10, y 20). Cada inyección fue subcutánea y contenía 132 microgramos (o 6 nanomoles) de proteína en una disolución salina isotónica tamponada sin la adición de ningún adyuvante conocido.

Paralelamente, se inmunizaron tres pollos, según el mismo calendario, con 6 nanomoles de proteína AVD108.

Se extrajo sangre de cada animal en el día 35, y los títulos de anticuerpos contra el antígeno de Plasmodium yoelii recombinante se midieron mediante ELISA. Los resultados fueron los siguientes:

Los pollos que recibieron la proteína AVD262 tuvieron títulos de anticuerpos de 400, mientras que los pollos que recibieron la proteína AVD108 tuvieron títulos de anticuerpos de 1.600.

Ejemplo 7: Títulos de anticuerpos contra los dominios de oligomerización C4bp

Se midieron títulos de anticuerpos contra los dominios de oligomerización C4bp tanto murino como de pollo en ratones y pollos que se inmunizaron con las proteínas AVD108 y AVD262. Los ratones que se inmunizaron con la proteína AVD108 tuvieron títulos, medidos mediante ELISA frente al dominio de oligomerización C4bp de ratón recombinante, de 1600, pero tuvieron títulos de anticuerpos indetectables frente a la proteína AVD259 recombinante (sin diferencia entre títulos preinmunitarios y los del día 43). Los ratones que se inmunizaron con la proteína AVD262 tuvieron en el día 43 títulos de 0 frente al dominio C4bp murino (es decir, no hubo ninguna diferencia entre los sueros preinmunitarios y los del día 43), pero estos ratones tuvieron en el día 43 títulos de 12.800 frente a la proteína AVD259. Esto demuestra que los ratones inmunizados con la proteína de fusión del dominio C4bp no de mamífero no producen anticuerpos frente al dominio C4bp murino endógeno, mientras que el uso del dominio de oligomerización C4bp murino para inmunizar ratones sí da como resultado la inducción de anticuerpos frente al dominio endógeno.

Los pollos inmunizados con las mismas dos proteínas (AVD108 y AVD262) mostraron resultados complementarios. De este modo, los pollos inmunizados con la proteína AVD262 tuvieron títulos de anticuerpos de 102.000 frente a la proteína AVD259, pero 0 frente al dominio de oligomerización C4bp murino. Los pollos inmunizados con la proteína AVD108 tuvieron anticuerpos indetectables frente a la proteína AVD259, pero tuvieron títulos de anticuerpos de 800 frente al dominio de oligomerización C4bp murino. No hubo anticuerpos detectables en sueros preinmunitarios frente al dominio murino.

Ejemplo 8: Aislamiento de otras secuencias de C4bp no de mamífero

La secuencia nucleotídica que codifica el dominio de oligomerización C4bp de pollo (mostrado en la figura 1) se usó para buscar la secuencia de ADN genómico incompleta del diamante mandarín (Taeniopygia guttata) usando el programa megablast discontinuo proporcionado por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/tracemb.shtml>). Se encontraron varias secuencias traza que contienen una secuencia idéntica de 153 nucleótidos que codifica el dominio de oligomerización C4bp del diamante mandarín.

El dominio de oligomerización C4bp del diamante mandarín tiene la secuencia de ácido nucleico SEC ID n°: 22 como sigue:

```
ATGAAAGAAGGTGATGGTGATGTGTCTCAAGAGGTTTATTACATTAAATCGACCTTTGAATGTG
GTGTGCCTGTAGAAGAAGTGAAAAATCTGTCTGGAAATACAGAAACTGCTCCTGGAGATTAAACAA
ACTAGAGATGGAGCTAGAAAACTAA
```

El dominio de oligomerización C4bp del diamante mandarín tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 23 como sigue:

```
MKEGDDGVCQEVHYIKSTFECGVPVEEVKILLEIKLLLEINKLEMELEN
```

Un alineamiento del dominio de oligomerización C4bp del diamante mandarín con el del pollo muestra que sólo 48% (30/62) de los restos de aminoácidos alineados son idénticos (destacados en negrita). De este modo, la identificación de dominios de oligomerización C4bp homólogos usando la secuencia de ADN de pollo es factible incluso en bases de datos de secuencias de ADN brutas.

DO Variante	KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTEDVKTLLEIRKLFLEI
Diamante mandarín	MKEGDDGVCQEVHYIKSTF ECGVPVEEVKILLEIKLLLEI
DO Variante	QKLKVELQGLSKEFLEHILH*

Diamante mandarín

NKLEMELEN*

Ejemplo 9: Demostración de la actividad de un mutante de truncamiento del dominio C4bp de pollo

- 5 La proteína AVD262 descrita en el ejemplo 3 se truncó eliminando los últimos siete aminoácidos C-terminales. El gen que codifica la versión truncada del dominio C4bp se amplificó mediante PCR usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

10 oAVD623: GGGGGAATTCCTTATTACTCCTTGCTCAGTCCTTGCAATTCC (SEC ID n°:24)
T7F: TAATACGACTCACTATAGGG (SEC ID n°:25)

El producto de la PCR se digirió mediante las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y se volvió a clonar entre los mismos sitios del vector pAVD262, creando así el plásmido pAVD317.

- 15 La secuencia de aminoácidos de la proteína AVD317 codificada por este constructo es SEC ID n°: 26 como sigue:

MRSHIASIAL NNLNKSGLVG EGESKKILAK MLNMDGMDLL GVDPKHVCVD
TRDIPKNAGC FRDDNGTEEW RCLLGYKKGE GNTCVENNNP TCDINNGGCD
PTASCQNAES TENSKKIICT CKEPTPNAYY EGVFCSSSGS KKQGDADVCG
EVAYIQSVVS DCHVPTEDVK TLEIRKLFL EIQLKVELQ GLSKE

- 20 El esquema de purificación descrito para la proteína AVD262 se usó para purificar la proteína AVD317.

Se inmunizaron ratones usando el mismo calendario de inmunización como en el ejemplo 4, a saber, se inmunizaron tres ratones BALB/c sin la adición de ningún adyuvante. La proteína purificada estaba en una disolución salina isotónica tamponada. Se usaron dos nanomoles de proteína por inyección, y a cada ratón se le inyectó subcutáneamente dos veces, con un intervalo de cuatro semanas entre las dos inyecciones (o en otras palabras, en los días 0 y 29). Todos los ratones se sangraron en el día 43, y sus títulos de anticuerpos frente al antígeno recombinante de Plasmodium yoelii se midieron mediante ELISA.

Los ratones que se inyectaron con AVD317 sin ningún adyuvante tuvieron títulos de anticuerpos de 104.000, mostrando que el truncamiento no disminuyó la actividad biológica del dominio C4bp de pollo.

Ejemplo 10: El mutante de truncamiento del ejemplo 9 hace solubles a las proteínas de fusión insolubles

Las proteínas AVD290 y AVD291 se generaron fusionando la hormona peptídica GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) a la forma larga o corta del dominio, respectivamente. AVD290 se creó hibridando los dos oligonucleótidos siguientes:

oAVD607: 5' TATGGAACATTGGAGCTATGGCCTGCGTCCGGGCG 3' (SEC ID n°:27)
oAVD608: 5' GATCCGCCCCGACGCAGGCCATAGCTCCAATGTTCCA 3' (SEC ID n°:28)

- 40 Los oligonucleótidos hibridados se clonaron entre los sitios NdeI y BamHI del plásmido pAVD262.

Los mismos dos oligonucleótidos se clonaron entre los sitios NdeI y BamHI de pAVD317, para crear el plásmido pAVD291.

- 45 La secuencia nucleotídica que codifica la proteína de fusión AVD290 es SEC ID n°: 29 como sigue:

ATGGAACATTGGAGCTATGGCCTGCGTCCGGGCGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGT
GCGGAGAGGTTGCTTATATTTCAGAGCGTCTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGAGGACGTGAA
AACTCTGCTGGAATAACGAAACTCTTCTGGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGGAATTGCAAGGA
CTGAGCAAGGAGTTCTTGGAGCACATTCTGCACTAA

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AVD290 codificada por este constructo es SEC ID n°: 30 como sigue:

MEHWSYGLRP GGSKKQGDAD VCGEVAYIQS VVSDCHVPTE DVKTLLLEIRK
LFLEIQKLKV ELQGLSKEFL EHILH

La secuencia nucleotídica que codifica la proteína de fusión AVD291 es SEC ID n°: 31 como sigue:

ATGGAACATTGGAGCTATGGCCTGCGTCCGGGCGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGT
GCGGAGAGGTTGCTTATATTACAGAGCGTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGAGGACGTGAA
AACTCTGCTGGAAATACGAAAACCTCTTCTGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGGAATTGCAAGGA
CTGAGCAAGGACTAA

- 5 La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AVD291 codificada por este constructo es SEC ID n°: 32 como sigue:

MEHWSYGLRP GGSKKQGDAD VCGEVAYIQS VVSDCHVPTE DVKTLLEIRK
LFLEIQKLKV ELQGLSKE

- 10 Se encontró que la proteína AVD290 era >90% insoluble cuando se indujo la expresión en la cepa C41(DE3), usando las siguientes condiciones de inducción: se añadió 0,5 mM de IPTG cuando la OD600 fue 0,5, y la incubación se continuó durante tres horas antes de que se cosecharan las bacterias. Las bacterias se lisaron mediante interrupción en un aparato Emulsiflex. En condiciones de inducción idénticas, la proteína AVD291 fue soluble. La proteína AVD291 incluso siguió siendo soluble después de que el extracto de las bacterias lisadas se calentó a 75°C durante 15 minutos, que hizo insolubles a la mayoría de las proteínas bacterianas.

Estos resultados ilustran que la supresión de los últimos siete aminoácidos del dominio de pollo puede alterar drásticamente la solubilidad de una proteína de fusión.

- 20 Como resultado, la purificación se simplificó enormemente. Las etapas finales de purificación se realizaron vía cromatografía de intercambio iónico en DEAE en un tampón de 20 mM de TrisHCl, pH 7,0 (elución con un gradiente salino, diez volúmenes de columna de NaCl 1M en el mismo tampón) y cromatografía en gel de exclusión de tamaños en una columna Superdex S75 26/60.

25 **Ejemplo 11: El término C del dominio C4bp de pollo no truncado facilita la purificación proteica**

- Como se discute en ejemplos previos, las proteínas AVD262 y AVD317 difieren solamente por la presencia o ausencia de siete aminoácidos en el término C. La proteína AVD262 se purificó en una columna de cromatografía de afinidad de níquel (Ni-NTA de GE) a la que se une, y a partir de la cual se puede eluir mediante la adición de imidazol al mismo tampón usado para la unión. La proteína AVD317 no se une a la columna en condiciones idénticas.

- Las bacterias que expresan la proteína AVD262 se lisaron en un tampón que contiene sólo 10 mM de TrisHCl pH 7,0, y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 10.000 rpm en un rotor Sorvall S34. Al nuevo sobrenadante, se añadió NaCl hasta una concentración final de 300 mM, y la disolución se incubó con Ni-NTA durante 1 hora a 4 C. Toda la disolución se vertió entonces en una columna y se lavó en primer lugar con una disolución que contiene 50 mM de NaPO4, 300 mM de NaCl y 0,1% de Triton X-100, pH 7,5, y después con el mismo tampón que carece de Triton X-100. La proteína AVD262 se eluyó con una disolución de 200 mM de imidazol, 150 mM de NaCl pH 8,0.

40 **Ejemplo 12: La fusión al dominio C4bp de pollo hace muy inmunógenos a los antígenos endógenos**

- Se ensayó la inmunogenicidad de GnRH cuando se fusiona al dominio truncado (AVD291) inmunizando ratones con la proteína AVD291.

- Se inmunizaron tres ratones BALB/c con 2 nanomoles de la proteína AVD291. Cada ratón se inyectó dos veces, subcutáneamente, en los días 0 y 29. Todos los ratones se sangraron en el día 43, y sus títulos de anticuerpo se midieron frente a la proteína recombinante obtenida fusionando el antígeno de GnRH al término C de la proteína glutatona S-transferasa (GST).

- 50 Dos ratones tuvieron un título de anticuerpos de 5.120, mientras que el tercero tuvo un título de anticuerpos de 10.240. Además, tres ratones que recibieron la proteína AVD291 según el mismo protocolo de inmunización, pero en adyuvante completo de Freund para la primera inyección y en adyuvante incompleto de Freund para la segunda, tuvieron títulos de anticuerpos de 5.120, 10.240 y 20.480, respectivamente.

- 55 Esto muestra que la fusión al dominio C4bp de pollo truncado hace muy inmunógeno a GnRH, y que la inmunogenicidad se puede incrementar adicionalmente mediante la adición de un adyuvante.

Ejemplo 13: La mutación de cuatro aminoácidos consecutivos no disminuye la actividad biológica del dominio C4bp de pollo

El plásmido pAVD317 se mutó usando un kit mutagénesis dirigida al sitio que contiene Pfu Ultra de Stratagene y los dos oligonucleótidos siguientes:

oAVD619: CCGATTGCCACGTGCCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGGAAATACGAAAACCTC (SEC ID n°: 33)

oAVD620: GAGTTTTCGTATTTCCAGCAGAGTACGCAGTTCCGCTGTAGGCACGTGGCAATCGG (SEC ID n°: 34).

La secuencia nucleotídica que codifica la proteína de fusión de AVD313 es SEC ID n°: 35 como sigue:

ATGAGATCTCACATTGCCTCTATTGCTTTGAACAACCTTGAACAAGTCTGCTTTGGTAGGAGAAG
GTGAGTCTAAGAAGATTTTGGCTAAGATGCTGAACATGGACGGTATGGACTTGTGGGTGTTGA
CCCTAAGCATGTTTGTGTTGACACTAGAGACATTCTTAAGAACGCTGGATGTTTCAGAGACGAC
AACGGTACTGAAGAGTGGAGATGTTTGTGGGTTACAAGAAGGGTGAGGGTAACACCTGCGTTG
AGAACAACAACCTACTTGGGACATCAACAACGGTGGATGTGACCCAACCGCCTCTGTGCAAAA
CGCTGAATCTACCGAAAACCTCCAAGAAGATTATTTGCACCTGTAAGGAACCAACCCCTAACGCC
TACTACGAGGGTGTCTTCTGTTCTTCTCCGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCG
GAGAGGTGCTTATATTAGAGCGTCTGCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGCGGAACTGCGTAC
TCTGCTGGAAATACGAAAACCTCTTCTGGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGGAATTGCAAGGACTG
AGCAAGGAGTAATAAGGAATTC

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AVD313 codificada por este constructo es SEC ID n°: 36 como sigue:

MRSHIASIAL NNLNKSGLVG EGESKKILAK MLNMDGMDLL GVDPKHVCVD
TRDIPKNAGC FRDDNGTEEW RCLLGYYKKGE GNTCVENNNP TCDINNGGCD
PTASCONAES TENSCKIICT CKEPTPNAYY EGVFCSSSGS KKQGDADVCG
EVAYIQSVVS DCHVPTAEIR TLLEIRKLFL EIQKLKVELQ GLSKE

La proteína AVD313 se purificó usando los mismos tampones y columnas que se usaron para la proteína AVD262.

Se inmunizaron seis ratones BALB/c con 2 nanomoles de la proteína AVD313. A cada ratón se le inyectó dos veces, subcutáneamente, en los días 0 y 29. Todos los ratones se sangraron en el día 43, y se midieron sus títulos de anticuerpos frente al antígeno de Plasmodium yoelii recombinante.

Todos los ratones a los que se les había inyectado AVD313 sola tuvieron títulos de anticuerpos de 204.000, mostrando que el truncamiento y la mutación del dominio C4bp de pollo no ha disminuido su actividad biológica.

Las alteraciones de cuatro aminoácidos en AVD313, en comparación con AVD317, están subrayadas en la secuencia de aminoácidos de AVD313 como se muestra en SEC ID n°: 36. El dominio C4bp de pollo modificado en la proteína de fusión AVD313 tiene menos de 20% de identidad con el dominio C4bp humano, y de este modo es muy preferido para uso a la hora de inmunizar seres humanos, ya que la probabilidad de provocar anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con C4bp humana es muy baja.

Ejemplo 14: El dominio CRES comparte la actividad biológica del dominio C4bp de pollo

Se examinó si el dominio CRES (mostrado en la figura 1) también aumenta la inmunogenicidad de antígenos. El dominio CRES en la figura 1 tiene la siguiente secuencia de aminoácido:

SEC ID n°: 37: PPNCKTFYVRKKIDQIKETFDGCLPLAELRTLLEVVQKLYLEIQKLEKELGAKGGRWWP

La secuencia nucleotídica que codifica el dominio CRES se amplificó a partir de ADN genómico de pollo usando los dos cebadores oligonucleotídicos siguientes:

oAVD467: GGGGGGATCCAAAACATTTTACGTACGCAAGAAGATTGATCAAATAAAGG (SEC ID n°: 38)
 OAVD468: GGGGGAATTCTTATTACGGCCACCAGCGGCCTCCTTTGGC (SEC ID n°: 39).

- 5 El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y se clonó entre los mismos sitios en el vector pAVD262, creando así el plásmido pAVD314.

La secuencia nucleotídica que codifica la proteína de fusión de AVD314 es SEC ID n°: 40 como sigue:

10
 ATGAGATCTCACATTGCCTCTATTGCTTTGAACAACCTTGAACAAGTCTGGTTTGGTAGGAGAAG
 GTGAGTCTAAGAAGATTTTGGCTAAGATGCTGAACATGGACGGTATGGACTTGTGGGTGTTGA
 CCTAAGCATGTTTGTGTTGACACTAGAGACATTCCTAAGAACGCTGGATGTTTCAGAGACGAC
 AACGGTACTGAAGAGTGGAGATGTTTGTGGGTTACAAGAAGGGTGAGGGTAACACCTGCGTTG
 AGAACAACAACCCCTACTTGCGACATCAACAACGGTGGATGTGACCCAACCGCCTCTTGTCAAAA
 CGCTGAATCTACCGAAACTCCAAGAAGATTATTTGCACCTGTAAGGAACCAACCCCTAACGCC
 TACTACGAGGGTGTTTTCTGTTCTTCTCCGGATCCAAAACATTTTACGTACGCAAGAAGATTG
 ATCAAATAAAGGAAACTTTTGATTGCGGATTGCCTCTGGCAGAACTGAGAACTCTGCTGGAAGT
 ACAGAAGCTCTACCTGGAGATCCAGAAGCTGGAGAAGGAGCTGGGAGCCAAAGGAGGCCGCTGG
 TGGCCGTAATAAGAATTC

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AVD314 codificada por este constructo es SEC ID n°: 41 como sigue:

15
 MRSHIASIAL NNLNKSLVG EGESKKILAK MLNMDGMDLL GVDPKHVCVD
 TRDIPKNAGC FRDDNGTEEW RCLLGYYKKE GNTCVENNNP TCDINNGGCD
 PTASCQNAES TENSKKIICT CKEPTPNAYY EGVFCSSSGS KTFYVRKKID
 QIKETFDCGL PLAEELRTLE VQKLYLEIQK LEKELGAKGG RWWP

La proteína AVD314 se purificó usando los mismos tampones y columnas que se usaron para la proteína AVD262.

- 20 Se inmunizaron tres ratones BALV/c con 2 nanomoles de la proteína AVD314. A cada ratón se le inyectó dos veces, subcutáneamente, en los días 0 y 29. Todos los ratones se sangraron en el día 43, y se midieron sus títulos de anticuerpos frente al antígeno de Plasmodium yoelii recombinante.

- 25 Todos los ratones a los que se inyectaron con AVD314 sola tuvieron títulos de anticuerpos de 51.200, en comparación con los títulos de 204.000 con la proteína AVD262. Esto muestra que el dominio CRES, al igual que el dominio C4bp de pollo, tiene actividad biológica y puede incrementar significativamente la inmunogenicidad de antígenos.

REIVINDICACIONES

1. Dominio C4bp capaz de formar multímeros y que tiene al menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID n°: 1.
2. Dominio C4bp según la reivindicación 1, que consiste en los restos 1-62 de SEC ID n°: 1.
3. Dominio C4bp según la reivindicación 1, en el que dicho dominio C4bp es un fragmento de al menos 48 aminoácidos contiguos de SEC ID n°: 1.
4. Dominio C4bp según la reivindicación 1, en el que dicho dominio C4bp comprende una supresión N-terminal y/o C-terminal de 1 a 8 aminoácidos de SEC ID n°: 1.
5. Dominio C4bp según la reivindicación 1, en el que dicho dominio C4bp comprende de 1 a 8 sustituciones de aminoácidos en el dominio C4bp de SEC ID n°: 1.
6. Dominio C4bp según la reivindicación 1, en el que dicho dominio C4bp tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos SEC ID n°s: 5-14, SEC ID n°: 42 y SEC ID n°: 43.
7. Producto que comprende un dominio C4bp no de mamífero como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y un antígeno.
8. Producto según la reivindicación 7, en el que dicho antígeno está fusionado al término N o C de dicho dominio C4bp, opcionalmente vía un enlazador flexible.
9. Producto según la reivindicación 7 u 8, en el que dicho antígeno es endógeno en seres humanos.
10. Producto según la reivindicación 9, en el que el antígeno es hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).
11. Composición que comprende el producto de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, junto con un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
12. Producto según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, o la composición de la reivindicación 11, para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
13. Vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de un dominio C4bp no de mamífero como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y un antígeno polipeptídico, enlazado funcionalmente a un promotor funcional en una célula hospedante.

Figura 1

```

AAG AAG CAA GGT GAT GCT GAT GTG TGC GGA GAG GTT GCT TAT ATT CAG AGC GTC GTC TCC 60
K K Q G D A D V C G E V A Y I Q S V V S 20

GAT TGC CAC GTG CCT ACA GAG GAC GTG AAA ACT CTG CTG GAG ATA CGA AAA CTC TTC CTG 120
D C H V P T E D V K T L L E I R K L F L 40

GAG ATT CAA AAA CTG AAG GTG GAA TTG CAA GGA CTG AGC AAG GAG TTC CTG GAG CAC ATT 180
E I Q K L K V E L Q G L S K E F L E H I 60

CTG CAC TGA 189
L H * 62

```

Figura 2

CRES	656	PPNCKTFYVRKKIDQIKETFDGGLPLAELRTLLEVQKLYLEIQKLEKELGAKGGRWWP	713
Dominio oligo de pollito	1	KKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTEDVKTLLEIRKLFLEIQKLVQLQGLSKEFLEHILH	62
C4bp humana	492	ETPEGCEQVLTGKRLNQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDSARQSTLDKEL	549

Figura 3

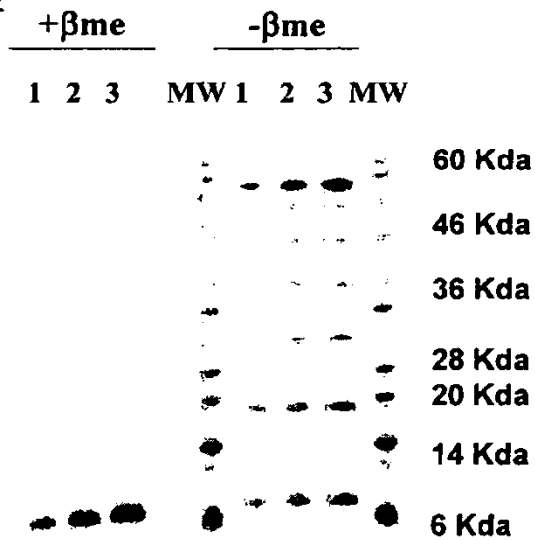


Figura 4

