

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 640**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/89 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2001** **E 01956081 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013** **EP 1363938**

54 Título: **Vacuna molecular que lleva unida un polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático a un antígeno**

30 Prioridad:

03.08.2000 US 222902 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2014

73 Titular/es:

**JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
720 RUTLAND AVENUE
BALTIMORE, MD 21205, US**

72 Inventor/es:

**WU, TZYY-CHOOU y
HUNG, CHIEN-FU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 454 640 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

Vacuna molecular que lleva unida un polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático a un antígeno

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 Esta invención, del campo de la inmunología y de la medicina, da a conocer composiciones para ser usadas como una vacuna en un procedimiento para inducir respuestas inmunitarias específicas de antígeno (realizadas), en particular las mediadas por los linfocitos T citotóxicos (LTC), mediante el uso de moléculas de ácido nucleico quiméricas o híbridas que codifican el polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático, la calreticulina, y un antígeno peptídico o polipeptídico. Se dan a conocer vacunas con replicones de ARN autorreplicante y con ADN desnudo.

Descripción de la técnica anterior

- 15 Las vacunas con ADN se han convertido en una estrategia atractiva para inducir la inmunoterapia específica de antígeno. Las formas de las vacunas con ADN incluyen ADN «desnudo», tal como el ADN plasmídico (patente de los EE.UU. n.º 5.580.859, 5.589.466, 5.703.055), ADN vírico y similares. Básicamente se administra a un individuo una molécula de ADN que codifica una proteína o péptido inmunógeno deseado y la proteína se genera *in vivo*. El uso de vacunas con ADN «desnudo» tiene las ventajas de ser seguro porque, p. ej., el plásmido en sí es poco inmunógeno, se puede preparar con facilidad con gran pureza y, en comparación a las proteínas u otros reactivos biológicos, es muy estable. Sin embargo, las vacunas con ADN tienen una potencia limitada. Se han aplicado varias estrategias para incrementar la potencia de las vacunas con ADN, entre ellas, p. ej., actuar selectivamente sobre antígenos para que se degraden rápidamente dentro de la célula; dirigir antígenos a las células presentadoras de antígeno (CPA) mediante la fusión a ligandos de los receptores de las CPA; fusión de antígenos a quimiocinas o a secuencias patógenas antigénicas, coinyección con citocinas o moléculas coestimuladoras o composiciones adyuvantes.

- 25 Las vacunas contra el cáncer son una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer porque pueden tener la capacidad de erradicar el tumor sistémico en muchos sitios del organismo y la especificidad de discriminar entre las células neoplásicas y las que no son neoplásicas (Pardoll (1998) *Nature Med.* 4: 525-531). Los efectos antitumorales del sistema inmunitario están mediados principalmente por la inmunidad celular. El componente del sistema inmunitario mediado por las células está equipado con muchos mecanismos efectores capaces de erradicar los tumores, y la mayoría de estas respuestas inmunitarias antitumorales están reguladas por los linfocitos T. Por lo tanto, se espera que, para controlar los tumores, se desarrollen las vacunas contra el cáncer, en particular como vacunas con ADN, con el objetivo de realzar la respuesta de linfocitos T específicos del tumor.

- 35 Las proteínas oncogénicas del VPH, E6 y E7, se coexpresan en la mayoría de los cánceres de cuello uterino asociados al VPH y son importantes para la inducción y el mantenimiento de la transformación celular. Por lo tanto, las vacunas que actúan selectivamente sobre las proteínas E6 o E7 pueden ser capaces de prevenir y tratar los cánceres de cuello uterino asociados al VPH. En una serie de vacunas contra el VPH se ha explotado la E7 del VPH-16, una proteína nuclear/citoplasmática bien caracterizada que está más conservada que la E6 en las células cancerosas asociadas al VPH.

- 40 La calreticulina (CRT), una proteína abundante de 46 kDa que se localiza en la luz del retículo endoplasmático (RE) de la célula, muestra una actividad lectina y participa en el plegamiento y ensamblaje de las glucoproteínas nacientes. Véase, p. ej., Nash (1994) *Mol. Cell. Biochem.* 135: 71-78; Hebert (1997) *J. Cell Biol.* 139: 613-623; Vassilakos (1998) *Biochemistry* 37: 3480-3490; Spiro (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 11588-11594. La CRT se asocia a los péptidos transportados al interior del RE por los transportadores que están relacionados con el procesamiento de los antígenos, tal como TAP-1 y TAP-2 (Spee (1997) *Eur. J. Immunol.* 27: 2441-2449). La CRT también forma complejos *in vitro* con los péptidos. Tras administrar los complejos a los ratones, estos desencadenaron respuestas de linfocitos T CD8+ específicos del péptido (Basu (1999) *J. Exp. Med.* 189: 797-802; Nair (1999) *J. Immunol.* 162: 6426-6432). La CRT purificada de tumores murinos desencadenó inmunidad específica contra el tumor del cual se tomó la CRT, pero no contra un tumor con otros antígenos (Basu, véase más arriba). Mediante la sensibilización *in vitro* de células dendríticas (CD) de ratón con un complejo CRT-péptido, el péptido volvió a ser presentado por las moléculas de clase I del CMH de las CD para estimular una respuesta de LTC específicos del péptido (Nair, véase más arriba).

- 50 La CRT también tiene efectos antiangiogénicos. La CRT y un fragmento que comprende los restos aminoácidos 1 a 180, que se ha llamado «vasostatina», son inhibidores de las células endoteliales que pueden suprimir el crecimiento tumoral (Pike (1999) *Blood* 94: 2461-2468). El crecimiento tumoral y la metástasis dependen de la existencia de un riego sanguíneo adecuado. A medida que crecen los tumores, el riego sanguíneo adecuado del tejido tumoral a menudo queda garantizado por la formación de nuevos vasos, un proceso denominado angiogénesis (Folkman (1982) *Ann. NY Acad. Sci.* 401: 212-27; Hanahan (1996) *Cell* 86: 353-364). Los agentes terapéuticos que actúan selectivamente sobre la vasculatura tumoral y la dañan pueden prevenir o retrasar el crecimiento tumoral e incluso favorecer la regresión o la inactividad.

Las vacunas con ARN autorreplicante (replicones de ARN) han emergido como una forma más potente e importante de vacunas con ácidos nucleicos. Las vacunas con replicones de ARN pueden proceder de vectores de alfavirus, tales como los vectores del virus de Sindbis (Xiong (1989) *Science* 243: 1188-1191), del virus de la selva del Semliki (Ying (1999) *Nature Med.* 5: 823-827) o del virus de la encefalitis equina venezolana (Pushko (1997) *Virology* 239: 389-401). Estas vacunas son autorreplicantes y autolimitantes, y se pueden administrar tanto como ARN o como ADN que se transcribe a continuación en replicones de ARN en las células transfectadas o *in vivo* (Berglund (1998) *Nature Biotechnol.* 16: 562-565). El ARN autorreplicante infecta un amplio abanico de tipos celulares y permite que el antígeno de interés se exprese en gran cantidad (Huang (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 531-535). Adicionalmente, el ARN autorreplicante acaba provocando la lisis de las células transfectadas porque la replicación vírica es tóxica para las células hospedadoras infectadas (Frolov (1996) *J. Virol.* 70: 1182-1190). Por lo tanto, estos vectores no incrementan el problema que conllevan las vacunas con ADN desnudo sobre su integración en el genoma hospedador. Esto es particularmente importante para el desarrollo de vacunas que actúan selectivamente sobre proteínas que son potencialmente oncogénicas, tales como las proteínas E6 y E7 del VPH.

Chen (2000) *Cancer Research* 60: 1035-1042 demostró que la unión del antígeno E7 del virus del papiloma humano de tipo 16 (VPH-16) a la proteína 70 de choque térmico (HSP70) de *Mycobacterium tuberculosis* acaba reforzando la potencia de la vacuna con ADN. Otros estudios han demostrado que la inmunización con complejos de proteínas de choque térmico (HSP, por su nombre en inglés) aislados de células del tumor o infectadas con el virus son capaces de inducir unas potentes inmunidad antitumoral (Janetzki (1998) *J. Immunother.* 21: 269-276) o inmunidad antivírica (Heikema (1997) *Immunol. Lett.* 57: 69-74). Los complejos inmunógenos HSP-péptido también se pueden reconstituir *in vitro* mediante la mezcla de los péptidos con las HSP (Ciupitu (1998) *J. Exp. Med.* 187: 685-691). Las vacunas con proteínas basadas en las HSP también se pueden administrar mediante la fusión de los antígenos a las HSP (Suzue (1996) *J. Immunol.* 156: 873-879, la proteína de fusión a HSP70 desencadenó las respuestas inmunitarias celular y humoral contra la p24 del VIH-1). Estos experimentos demuestran que 1) los complejos HSP-péptido procedentes de células tumorales o de células infectadas con el virus pueden estimular la inmunidad específica contra el virus o el tumor; 2) la especificidad de esta respuesta inmunitaria está causada por péptidos procedentes del tumor que están unidos a la HSP, y no está causada por las propias HSP; y 3) la respuesta inmunitaria se puede inducir en los ratones con el CMH bien idéntico o diferente al CMH de las HSP del donante (Przepiorka (1998) *Mol. Med. Today* 4: 478-484; Srivastava (1998) *Immunity* 8: 657-665). Aunque estas investigaciones han hecho que el uso de las HSP se vuelva más atractivo para las inmunoterapias, las únicas vacunas con HSP que se han ensayado hasta ahora están en forma de vacunas que contienen proteínas o vacunas que contienen ADN.

Trompeter et al. ((1996) *J. Biol. Chem.* 271: 1187-1193) se refieren a una proteína de unión al zinc de tipo silvestre (ZnBP) (es decir) sobreexpresada en las células COS y que se acumula exclusivamente en el núcleo. La ZnBP con un motivo PKRQKT mutado o eliminado aparece tanto en el núcleo como en el citoplasma. En cambio, las proteínas de fusión entre ZnBP y partes de la proteína del retículo endoplasmático calreticulina necesitaban que el PKRQKT estuviera intacto para que se importara en el núcleo.

Cavill et al. ((1999) *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 7: 150-155) se refiere a un anticuerpo monoclonal murino que reacciona con la calreticulina humana producida mediante la inmunización con una proteína de fusión entre la proteína de unión a la maltosa y la calreticulina expresada en *Escherichia coli*.

Shalinsky et al. ((1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 1905-1917) estudió *in vivo* los efectos de un inhibidor selectivo de las metaloproteasas sobre los tumores de cáncer de pulmón no microcítico humano quimiorresistente.

Ockert et al. ((1999) *Vaccine* 20: 63-65) revisó el análisis de las respuestas inmunitarias celular y humoral contra los tumores y los ensayos clínicos de la vacunación antitumoral y del tratamiento con anticuerpos.

La patente internacional WO 99/07860 se refiere a las composiciones que inducen una respuesta inmunitaria, preferiblemente celular, en particular una respuesta inmunitaria citolítica mediada por células, contra antígenos de proteínas del VPH humano expuestos por el VPH o mostrados por las células infectadas, que incluyen las células de tumores de cuello uterino u otros tumores.

Leitner et al ((2000) *Vaccine* 18: 765-777) revisó los conocimientos actuales de los mecanismos que subyacen a las actividades de estas nuevas vacunas. Se centra en las estrategias diseñadas para realzar su actividad, que incluyen el uso de secuencias inmunoestimulantes, células dendríticas, moléculas coestimulantes, y adyuvantes con citocinas y quimiocinas.

La patente internacional WO 99/65940 se refiere a las proteínas con propiedades antiangiogénicas, a y los procedimientos para utilizar dichas proteínas para inhibir la angiogénesis.

Compendio de la invención

La invención da a conocer un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica para ser usado como una vacuna, que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende al menos un péptido antigénico. El péptido antigénico puede comprender un epítipo que se fija al CMH de clase I. El péptido antigénico, p. ej., el epítipo del péptido que se fija al CMH de clase I, puede

tener entre aproximadamente 8 restos aminoacídicos y aproximadamente 11 restos aminoacídicos de longitud.

Así pues, la presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión para ser usado como una vacuna en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria (realizada) específica de antígeno, en donde dicha molécula comprende:

- 5 (a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende un polipéptido de calreticulina;
- (b) opcionalmente, fusionado en fase con la primera secuencia de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico conectora que codifica un péptido conector; y
- 10 (c) una segunda secuencia de ácido nucleico que está unida en fase a la primera secuencia de ácido nucleico o a la secuencia de ácido nucleico conectora y que codifica un polipéptido o péptido antigénico.

En una realización, el polipéptido de la calreticulina comprende un polipéptido de la calreticulina humana. En realizaciones alternativas, la secuencia del polipéptido de la calreticulina humana puede comprender la secuencia descrita en la figura 10, o puede consistir esencialmente en una secuencia desde el resto 1 al resto 180 de la secuencia descrita en la figura 10, o puede consistir esencialmente de una secuencia desde el resto 181 al resto 417 de la secuencia descrita en la figura 10.

- 15 En una realización, el antígeno (p. ej., el epítipo del péptido que se fija al CMH de clase I) procede de un microorganismo patógeno, p. ej., comprende un péptido expresado por un microorganismo patógeno. El microorganismo patógeno puede ser un virus tal como, p. ej., un virus del papiloma, un virus del herpes, un retrovirus (p. ej., un virus de la inmunodeficiencia, tal como el VIH-1), un adenovirus y similares. El virus del papiloma puede ser un virus del papiloma humano; por ejemplo, el antígeno (p. ej., el péptido que se fija a la clase I) puede proceder de un polipéptido E7 del VPH-16. En una realización, el polipéptido E7 del VPH-16 es sustancialmente no oncogénico, a saber, no se fija al péptido del retinoblastoma (pRB) o se fija al pRB con una afinidad tan baja que el polipéptido E7 del VPH-16 es esencialmente no oncogénico cuando se expresa o administra *in vivo*.

- 20 En las realizaciones alternativas, el microorganismo patógeno es una bacteria tal como *Bordetella pertussis*; *Ehrlichia chaffeensis*; *Staphylococcus aureus*; *Toxoplasma gondii*; *Legionella pneumophila*; *Brucella suis*; *Salmonella enterica*; *Mycobacterium avium*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Listeria monocytogenes*; *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*; *Rickettsia rickettsii*; o un hongo, tal como, p. ej., *Paracoccidioides brasiliensis*; u otro patógeno, p. ej., *Plasmodium falciparum*.

- 25 En otra realización, el epítipo que se fija al CMH de clase I procede de una célula tumoral. El epítipo del péptido procedente de la célula tumoral puede comprender un antígeno asociado al tumor, p. ej., un antígeno específico del tumor, tal como, p. ej., un antígeno HER-2/neu.

- 30 En una realización, la molécula de ácido nucleico recombinante o aislada está unida operativamente a un promotor tal como, p. ej., de una manera específica de tejido, inducible o constitutiva. El promotor se puede expresar en cualquier célula, entre ellas las células del sistema inmunitario, que incluyen, p. ej., las células presentadoras de antígeno (CPA), p. ej., de una manera específica de tejido, inducible o constitutiva.

En realizaciones alternativas, las CPA son células dendríticas, queratinocitos, astrocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos B, un microglíocito o células endoteliales activadas, y similares.

- 35 La invención también da a conocer un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende al menos un péptido antigénico para ser usada como una vacuna. En las realizaciones alternativas, el segundo dominio comprende un epítipo del péptido que se fija al CMH de clase I. En las realizaciones alternativas, el casete de expresión comprende un vector de expresión, un virus recombinante (p. ej., un adenovirus, un retrovirus) o un plásmido.

- 40 Así pues, la presente invención da a conocer un casete o vector de expresión para ser usado como una vacuna en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (realizada), cuyo vector o casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según se definió anteriormente está unida operativamente a:

(a) un promotor; y

(b) opcionalmente, otras secuencias reguladoras que regulan la expresión del ácido nucleico en una célula eucariota.

- 45 El casete de expresión puede comprender un replicón de ARN autorreplicante. El replicón de ARN autorreplicante puede comprender un vector de ARN autorreplicante del virus de Sindbis, tal como, p. ej., un vector de ARN autorreplicante del virus de Sindbis SINrep5 (patente de los EE.UU. n.º 5.217.879).

Así pues, la presente invención da a conocer una partícula para ser usada como una vacuna en un procedimiento

para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (realzada) que comprende una molécula de ácido nucleico, un vector o casete de expresión según se define anteriormente.

5 En una realización, la partícula aislada comprende un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende al menos dos dominios, en donde el primer dominio comprende un polipéptido de calreticulina y el segundo dominio comprende un epítipo del péptido que se fija al CMH de clase I. La partícula aislada puede comprender cualquier material adecuado para el bombardeo de partículas, tal como, p. ej., oro.

10 La invención también da a conocer una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende al menos un péptido antigénico para ser usado como una vacuna. En una realización, la célula comprende un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende al menos dos dominios, en donde el primer dominio comprende un polipéptido de calreticulina y el segundo dominio comprende un péptido que se fija al CMH de clase I. Así pues, la invención da a conocer una célula para ser usada como una vacuna en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (realzada) que se ha modificado para comprender una molécula de ácido nucleico, un vector o casete de expresión según se define anteriormente.

15 La célula puede estar transfectada, infectada, transducida, etc., con un ácido nucleico o infectada con un virus recombinante según se define anteriormente. La célula puede haber sido aislada de un animal transgénico no humano que comprende células que comprenden casetes de expresión de la invención. Cualquier célula puede comprender un casete de expresión de la invención, tal como, p. ej., células del sistema inmunitario o células presentadoras de antígeno (CPA). Las CPA pueden ser una célula dendrítica, un queratinocito, un macrófago, un monocito, un linfocito B, un astrocito, un microglócito o una célula endotelial activada.

20 También se describe el uso de un péptido quimérico que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende una calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende al menos un péptido antigénico. También se describe el uso de un polipéptido quimérico o de fusión que comprende:

(a) un primer polipéptido que comprende un polipéptido de calreticulina; y

(b) un segundo polipéptido que comprende un péptido o polipéptido antigénico, en donde el péptido o polipéptido antigénico es el polipéptido E7 del VPH-16, un fragmento antigénico del mismo, o una variante no oncogénica del polipéptido E7 del VPH-16.

30 El péptido antigénico puede comprender un epítipo peptídico que se fija al CMH de clase I. El polipéptido de chaperona del RE puede estar unido químicamente al péptido antigénico, p. ej., como una proteína de fusión (p. ej., un enlace peptídico) que puede ser, p. ej., sintético o producirse por técnicas recombinantes, *in vivo* o *in vitro*. Los dominios polipeptídicos pueden estar unidos mediante un conector químico flexible.

35 El primer dominio polipeptídico del polipéptido quimérico puede estar más cerca del extremo amino que el segundo dominio polipeptídico, o el segundo dominio polipeptídico puede estar más cerca del extremo amino que el primer dominio polipeptídico.

40 La invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende una composición de la invención capaz de inducir o realzar una respuesta inmunitaria específica de antígeno y un excipiente farmacéuticamente aceptable para ser usado como vacuna. Dentro de la invención, la composición comprende: una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende un péptido antigénico; un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; una partícula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende una calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; o una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico.

45 Así pues, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica para ser usada como vacuna en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (realzada), que comprende la molécula de ácido nucleico, el casete o vector de expresión, la célula de la invención, la partícula, todos según se define anteriormente o cualquier combinación de lo anterior y un excipiente farmacéutica e inmunitariamente aceptable.

50 La invención da a conocer una composición que comprende una composición de la invención capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (realzada) para ser usada como vacuna en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (realzada) que, en las realizaciones alternativas, puede ser: una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende un péptido

antigénico; un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; una partícula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; o una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; en donde se administra una cantidad de la composición que es suficiente para inducir o realzar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La respuesta inmunitaria específica de antígeno puede comprender una respuesta celular, tal como una respuesta de LTC CD8+. La respuesta inmunitaria específica de antígeno puede comprender también una respuesta mediada por anticuerpos, o una respuesta humoral y celular.

Al poner en práctica el procedimiento, la composición se puede administrar *ex vivo* o la composición se puede administrar *ex vivo* a una célula presentadora de antígeno (CPA). En las realizaciones alternativas, la CPA es una célula dendrítica, un queratinocito, un macrófago, un monocito, un linfocito B, un astrocito, un microglíocito o una célula endotelial activada. La CPA puede ser una célula humana. La CPA puede aislarse de una fuente *in vivo* o *in vitro*. El procedimiento puede comprender adicionalmente la administración de la CPA tratada *ex vivo* a un mamífero, a un humano, a un individuo histocompatible o al mismo individuo del cual se aisló. Otra posibilidad es que la composición se ha de administrar directamente *in vivo* a un mamífero, p. ej., a un humano.

La composición se puede administrar por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea. La composición, p. ej., el ácido nucleico, casete de expresión o partícula, se puede administrar mediante inyección biolística. La composición se puede administrar por vía intratumoral o peritumoral.

En las realizaciones alternativas del procedimiento, los péptidos antigénicos pueden proceder de un virus, tal como un virus del papiloma humano. El péptido antigénico puede ser un péptido E7 del VPH-16. El péptido antigénico puede ser un péptido específico del tumor o asociado al tumor, tal como un péptido HER-2/neu.

La invención da a conocer una composición de la invención para ser usada en un procedimiento para incrementar el número de LTC CD8+ específicos contra un antígeno deseado en un individuo, en donde la composición comprende: una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende un péptido antigénico; un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; una partícula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; o una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; en donde el epítipo del péptido que se fija al CMH de clase I procede del antígeno, y una cantidad de la composición suficiente para incrementar el número de LTC CD8+ específicos del antígeno a administrar.

La invención da a conocer una composición de la invención para ser usada en un procedimiento para inhibir el crecimiento de un tumor en un individuo, en donde la composición comprende: una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio polipeptídico que comprende un péptido antigénico; un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; una partícula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; o una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un primer dominio que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de calreticulina y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico; en donde se administra una cantidad de la composición suficiente para inhibir el crecimiento del tumor. En una realización de la invención, la composición se ha de administrar por vía intratumoral o peritumoral. La composición se puede coadministrar con una segunda composición que comprende actividad antiangiogénica, tal como angiostatina, endostatina o TIMP-2 o un equivalente de la misma, o una mezcla de los mismos. La composición se puede coadministrar con una composición para radioterapia o quimioterapia.

La invención también da a conocer construcciones de virus de ARN autorreplicante para ser usadas como vacuna que comprende ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que refuerzan la respuesta inmunitaria, que comprenden calreticulina y péptidos antigénicos. En una realización, el virus de ARN autorreplicante comprende un vector de ARN autorreplicante del virus de Sindbis, tal como SINrep5, como se explica más adelante en el ejemplo 2.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se presentan en los dibujos acompañantes y la descripción que viene a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de las construcciones de ADN recombinante que codifican calreticulina (CRT), el polipéptido E7 del VPH, y la proteína de fusión de la invención calreticulina/E7 (CRT/E7), tal y como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 5 La figura 2A muestra histogramas bidimensionales que resumen el análisis por FACS (citometría de flujo) de los esplenocitos de ratones vacunados con el control negativo y con el ADN que expresa solo la CRT, solo la E7, y la proteína de fusión CRT/E7 de la invención, y se tiñó con anticuerpos contra CD8 e INF- γ ; tal y como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante. La figura 2B muestra un resumen esquemático de los datos del histograma.

- 10 La figura 3 muestra un resumen esquemático de los datos que muestran la cantidad de anticuerpos contra la E7 del VPH-16 en el suero de los ratones vacunados según se determina mediante un ELISA directo dos semanas después de la última vacunación con la construcción sola y las construcciones que codifican la CRT sola, la E7 sola, la proteína de fusión CRT/E7 y una mezcla de dos construcciones que expresan CRT y E7 por separado, como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 15 La figura 4 muestra un resumen esquemático de los datos experimentales de la protección del tumor *in vivo*, en el que se vacunaron los ratones con diferentes construcciones de vacunas con ADN y más tarde se sometieron a una prueba de provocación con el tumor que expresa E7, tal y como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 20 La figura 5 muestra un resumen esquemático de los datos de experimentos en los que se inyectaron células tumorales a los ratones, y luego se vacunaron con diferentes construcciones de ADN desnudo (entre ellas, una dosis de refuerzo una semana después del día 1 de la vacunación); después de ese momento se valoró el número medio de nódulos en los pulmones; los datos se expresan como el número medio de nódulos de tumores metastásicos pulmonares $\pm$ EEM en función de los días tras la provocación con las células tumorales, como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 25 La figura 6 muestra un resumen esquemático de los datos de los ensayos de los LTC en los que se usan linfocitos T CD8+ específicos contra E7 restringidos por D^b como células efectoras contra las células diana 293 D^bK^b transfectadas con diferentes construcciones de ADN desnudo, tal y como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 30 La figura 7 muestra un resumen esquemático de los datos de un experimento de sensibilización cruzada para caracterizar la presentación de E7 con el CMH de clase I de las células dendríticas sensibilizadas con lisados celulares de células 293 D^bK^b transfectadas con diferentes construcciones de ADN desnudo. Los linfocitos T CD8+ específicos de E7 sirvieron de células efectoras; las CD procedentes de la médula ósea se sensibilizaron con una dilución en serie de lisados de células 293 D^bK^b transfectadas (50 mg/ml, 10 mg/ml, 2 mg/ml y 0,4 mg/ml); las CD se utilizaron de célula diana mientras que los linfocitos T CD8+ específicos de E7 sirvieron de células efectoras tal y como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 35 La figura 8 muestra un resumen esquemático de los datos de un experimento diseñado para evaluar la función de los polipéptidos de fusión CRT/E7 en comparación con el polipéptido E7 o el polipéptido CRT por separado para el tratamiento de metástasis tumorales de TC-1 en los pulmones sin ninguna célula efectora inmunitaria (a saber, en los ratones atímicos); los ratones atímicos se provocaron primero con células tumorales y dos días después se provocaron con células tumorales TC-1; los ratones se vacunaron después con diferentes construcciones de ADN desnudo. El día 9 y el día 16, a estos ratones se administró una dosis de refuerzo con el mismo plan que la primera vacunación. Los ratones se sacrificaron el día 21 y se evaluaron y contaron los nódulos pulmonares de cada ratón, tal y como se explica en el ejemplo 1 que se describe más adelante.

- 45 La figura 9A muestra un diagrama esquemático de las construcciones de ADN SINrep5, SINrep5-HSP70, SINrep5-E7, y SINrep5-E7/HSP70. La figura 9B muestra un diagrama esquemático del transcrito de ARN procedente de estas construcciones de ADN utilizando la ARN polimerasa de SP6 tal y como se describe en detalle en el ejemplo 2 que se detalla más adelante.

Las figuras 10A y 10B muestran las secuencias aminoácidas y de ácido nucleico de la calreticulina humana procedente del número de acceso de GenBank NM004343, respectivamente.

Descripción de las realizaciones preferidas

- 50 La invención da a conocer composiciones para ser usadas como una vacuna en un procedimiento para inducir respuestas inmunitarias realizadas, en particular respuestas inmunitarias de linfocitos T citotóxicos según se define en las reivindicaciones. Dondequiera que se mencione a partir de ahora una composición (farmacéutica), ácido nucleico, casete de expresión, partícula o célula de la invención, se debe comprender que se limita a «para ser usado como una vacuna en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria (realizada)», idéntico a lo expresado en las reivindicaciones. Los polipéptidos quiméricos que comprenden el polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático y al menos un péptido antigénico se pueden administrar «indirectamente» mediante la

administración de un ácido nucleico que codifica la molécula quimérica; la construcción de ácido nucleico; y así pues la proteína de fusión, se expresa *in vivo*. Los ácidos nucleicos o polipéptidos quiméricos se administran en forma de vacunas con ADN.

5 La proteína de fusión comprende al menos dos dominios: el primer dominio comprende un polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático y el segundo dominio comprende un péptido procedente de un antígeno contra el cual se desea inducir una respuesta inmunitaria. El polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático, o fragmento funcional o variación del mismo, comprende un polipéptido de calreticulina.

10 El segundo dominio de la molécula quimérica comprende un péptido antigénico, que puede proceder de un microorganismo patógeno, un cáncer o cualquier fuente para la cual se desea la inducción, el realce o la supresión de una respuesta inmunitaria. En una realización, el péptido comprende un epítipo del péptido unido al CMH de clase I.

Las composiciones de la invención se aplican para inducir o realzar respuestas inmunitarias. En una realización, las composiciones de la invención refuerzan sinérgicamente respuestas inmunitarias y efectos antitumorales a través tanto de mecanismos inmunitarios como de mecanismos antiangiogénicos.

15 Los experimentos descritos en la presente memoria demuestran que las composiciones para ser usadas de acuerdo con la invención pueden realzar una respuesta inmunitaria celular, en particular, una reactividad de los LTC, inducida por una vacuna con ADN que codifica un epítipo de un microorganismo patógeno humano. Se utilizó la E7 del VPH-16 humano. Se trata de un antígeno modelo para el desarrollo de vacunas, ya que los virus del papiloma humano (VPH), en particular el VPH-16, están asociados a la mayoría de los cánceres de cuello uterino de los humanos. La
20 proteína oncogénica E7 del VPH es importante para la inducción y el mantenimiento de la transformación celular y se coexpresa en la mayoría de los cánceres de cuello uterino que contienen el VPH y sus lesiones precursoras. Por lo tanto, las vacunas contra el cáncer, tales como las composiciones de la invención, que actúan selectivamente sobre la E7, se pueden utilizar para controlar las neoplasias asociadas al VPH (Wu (1994) *Curr. Opin. Immunol.* 6: 746-754).

25 Según se describe en el ejemplo 1 que se detalla más adelante, los resultados de estos experimentos demuestran que las vacunas con ADN que comprenden el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende la CRT unida al polipéptido E7 completo pueden realzar la potencia de las vacunas con ADN. Las vacunas con ADN de la invención que contienen el gen de la fusión CRT/E7 quimérica se administraron a los ratones mediante procedimientos biolísticos por vía subcutánea. Indujeron el incremento de precursores de los LTC CD8+ específicos
30 de E7, con lo que se mejora la protección inmunitaria contra los tumores. Este incremento de los precursores de los linfocitos T CD8+ específicos de E7 fue significativo en comparación con las vacunas con ADN que contenían solo el gen de CRT o el de E7 de tipo silvestre.

Además, el tratamiento de los ratones C57BL/6 (una cepa consanguínea con un sistema inmunitario normal) o ratones atímicos (una cepa que carece de linfocitos T y de un sistema inmunitario funcional) bien con el ADN de
35 CRT o bien con el ADN de CRT/E7 quimérico condujo a la reducción de los nódulos metastásicos pulmonares y a la inhibición de la angiogénesis dentro de los nódulos pulmonares. Así pues, las vacunas con ADN de la invención que codifican la CRT/E7 quimérica representan una estrategia única que combina estrategias inmunitarias y antiangiogénicas para generar efectos antitumorales potentes.

40 Tal y como se explica anteriormente, aunque las pruebas complementarias han hecho que el uso de las proteínas de choque térmico (HSP) resulte más atractivo para las inmunoterapias, las únicas vacunas con HSP que se han analizado hasta ahora son en forma de vacunas con proteínas o vacunas con ADN. Esta invención incorpora y describe por primera vez la administración de antígenos, tales como las HSP y los polipéptidos quiméricos, en forma de vacunas con ARN autorreplicante.

45 Tal y como se describe en el ejemplo 2 que se describe más adelante, la expresión de una proteína de fusión de E7 del virus del papiloma humano de tipo 16 (VPH-16) con la HSP70 en una vacuna con ARN autorreplicante realzó enormemente la potencia de este polipéptido antigénico cuando se expresó *in vivo*. Los resultados que se describen más abajo demuestran que, en los ratones vacunados, una vacuna de replicón de ARN que contiene el gen de la fusión E7/HSP70 indujo una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T específica de E7 significativamente más alta que las vacunas que contienen el gen de E7 de tipo silvestre. Los estudios *in vitro* demostraron que el antígeno
50 E7 de las células apoptóticas transfectadas con el replicón de ARN con E7/HSP70 puede ser captado por las células dendríticas procedentes de la médula ósea y ser presentado con más eficacia a través de la vía del CMH de clase I que las células apoptóticas transfectadas con el replicón de ARN con la E7 de tipo silvestre. La fusión de HSP70 a E7 convirtió una vacuna poco eficaz en una con una potencia significativa contra los tumores que expresan la E7. Estos resultados demostraron que el uso de vacunas con ARN autorreplicante puede potenciar la
55 inmunogenia de las proteínas de fusión.

Un posible mecanismo para realzar la respuesta inmunitaria *in vivo* de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno es la presentación del antígeno a través de la vía del CMH de clase I mediante la captación de cuerpos apoptóticos de las células que expresan el antígeno, también denominado «sensibilización cruzada». Tal y como se explica en el

ejemplo 2 que se describe más adelante, los ensayos de LTC demostraron que se mejora la presentación del polipéptido E7 del VPH por el CMH de clase I en las células dendríticas procedentes de la médula ósea sensibilizadas con células apoptóticas transfectadas con el ARN de SINrep5-E7/HSP70.

Definiciones

5 A menos que se defina de otra manera, toda la terminología científica y técnica utilizada en la presente memoria tiene el significado que conoce cualquier persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la siguiente terminología tiene el significado adscrito a ella, a menos que se especifique de otra manera.

10 La terminología «actividad antiangiogénica» tal y como se utiliza en la presente memoria hace referencia a cualquier forma de inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos (p. ej., capilar, arteriola, etc.); así pues, tal actividad incluiría un enlentecimiento del crecimiento de los vasos sanguíneos, o un sustituto del mismo, que incluye, p. ej., el enlentecimiento o inhibición del crecimiento de las células endoteliales.

15 La terminología «antígeno» o «inmunógeno» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición que comprende un péptido, polipéptido o proteína que es «antigénico» o «inmunógeno» cuando se administra (o se expresa *in vivo* mediante la administración de un ácido nucleico, p. ej., una vacuna de ADN) en una cantidad apropiada (una «cantidad inmunógenamente eficaz»), a saber, es capaz de desencadenar, aumentar o reforzar una respuesta inmunitaria celular y/o humoral bien sola o en combinación o unida o fusionada con otra sustancia (que se puede administrar de una vez o en varios intervalos).

20 La «calnexina» describe la bien caracterizada proteína de la membrana del retículo endoplasmático (RE) que funciona como una chaperona molecular y como un componente de la maquinaria del control de calidad del RE. La calreticulina es un análogo soluble de la calnexina. *In vivo*, la calreticulina y la calnexina desempeñan funciones importantes en el control de calidad durante la síntesis de las proteínas, su plegamiento y su modificación postraduccional. Los polipéptidos de la calnexina, y los equivalentes y análogos del mismo, son especies del género de polipéptidos de las chaperonas del RE, como se describe en la presente memoria (Wilson (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 21224-2132; Danilczyk (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 13089-15097; patente de los EE.UU. n.º 6.071.743 y 5.691.306).

La «calreticulina» o «CRT» describe la proteína residente de aproximadamente 46 kDa y bien caracterizada que reside en la luz del RE, que tiene actividad lectina y que participa en el plegamiento y el ensamblaje de las glucoproteínas nacientes. La CRT actúa como un polipéptido de «chaperona» y un miembro del complejo TAP del transportador del CMH de clase I; la CRT se asocia a los transportadores TAP 1 y TAP 2, a la tapasina, al polipéptido de la cadena pesada del CMH de clase I y a la microglobulina $\beta 2$ para funcionar en la carga de los epítopos peptídicos sobre las moléculas nacientes del CMH de clase I (Jorgensen (2000) *Eur. J. Biochem.* 267: 2945-2954). La terminología «calreticulina» o «CRT» se refiere a los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico que son sustancialmente idénticas (definida en la presente memoria) a las secuencias de la CRT de ejemplo según se describe en la presente memoria. Un polipéptido de CRT es un polipéptido que comprende una secuencia idéntica o sustancialmente idéntica (definida en la presente memoria) a la secuencia aminoacídica de la CRT. Una secuencia nucleotídica y aminoacídica de ejemplo para una CRT utilizada en las presentes composiciones y procedimientos son las SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2, respectivamente. La terminología «calreticulina» o «CRT» abarca las proteínas nativas así como las proteínas modificadas producidas por técnicas recombinantes que inducen una respuesta inmunitaria, entre ellas una respuesta de LTC. La terminología «calreticulina» o «CRT» abarca los homólogos y variantes alélicas de CRT, que incluye las variantes de proteínas nativas construidas mediante técnicas *in vitro*, y las proteínas aisladas de fuentes naturales. Los polipéptidos de CRT, y las secuencias que los codifican, también incluyen proteínas de fusión que comprenden secuencias que no son la CRT, en particular los péptidos que se unen al CMH de clase I; y también comprenden adicionalmente otros dominios, p. ej., etiquetas de epítopos, secuencias de reconocimiento de corte enzimático, secuencias señal, señales de secreción y similares.

La terminología «polipéptido de la chaperona del retículo endoplasmático» tal y como se utiliza en la presente memoria hace referencia a cualquier polipéptido que tiene sustancialmente la misma función chaperona de RE que las proteínas chaperónicas de ejemplo CRT, tapasina, ER60 o calnexina. Así pues, la terminología incluye todos los fragmentos funcionales o variantes o imitaciones de los mismos. Un polipéptido o péptido se puede escutar convencionalmente por su actividad como chaperona de RE mediante los ensayos conocidos en la técnica, tales como los que se presentan en el ejemplo 1. Aunque la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción concreto, las chaperonas favorecen *in vivo* el plegamiento y la oligomerización correctos de muchas glucoproteínas en el RE, entre ellas el ensamblaje de la molécula heterotrimérica del CMH de clase I (cadena pesada (H, por su nombre en inglés), $\beta 2m$ y péptido). También retienen los complejos heterotriméricos del CMH de clase I que no se han ensamblado completamente en el RE (Hauri (2000) *FEBS Lett.*, 476: 32-37).

La terminología «epítipo» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un determinante antigénico o sitio antigénico que interacciona con un anticuerpo o con un receptor de los linfocitos T (TCR, por su nombre en inglés), p. ej., las composiciones con el péptido que se fija al CMH de clase I utilizadas de acuerdo con la invención. Un «antígeno» es una molécula o estructura química que o bien induce una respuesta inmunitaria o bien es reconocida

específicamente o fijada por el producto de una respuesta inmunitaria, tal como un anticuerpo o un LTC. El «dominio» conformacional o estereoquímico específico al cual se fija un anticuerpo o un TCR es un «determinante antigénico» o «epítipo». Los TCR se unen a los epítipos de los péptidos que mantienen una asociación física con una tercera molécula, una proteína del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o de clase II.

- 5 La terminología «ER60», «GRP94» o «gp96» o «proteína 94 regulada de glucosa», tal y como se utiliza en la presente memoria, describe el polipéptido bien caracterizado de chaperona del RE que es el representante del RE de la familia de las proteínas 90 de choque térmico (HSP90) entre las proteínas inducidas por estrés. Éstas se fijan a un número escaso de proteínas en el vía secretora, posiblemente mediante el reconocimiento de los intermedios avanzados de plegamiento o de las proteínas que no están completamente ensambladas. Los polipéptidos de ER60, y los equivalentes y análogos de los mismos, son especies del género de los polipéptidos de la chaperona del RE, tal y como se describe en la presente memoria (Argon (1999) *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10: 495-505; Sastry (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 12023-12035; Nicchitta (1998) *Curr. Opin. Immunol.* 10: 103-109; patente de los EE.UU. n.º 5.981.706).

- 15 La terminología «casete de expresión» o «vector de expresión», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia nucleotídica que es capaz de alterar la expresión de una secuencia codificante de la proteína en un hospedador compatible con tales secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido operativamente a la secuencia que codifica el polipéptido; y, opcionalmente, a otras secuencias, p. ej., señales de terminación de la transcripción. También pueden estar incluidos los otros factores necesarios o útiles para efectuar la expresión, p. ej., los potenciadores. «Operativamente unido» se refiere a la unión de un promotor delante de una secuencia de ADN de tal forma que el promotor hace que se transcriba la secuencia del ADN. Así pues, los casetes de expresión incluyen plásmidos, virus recombinantes, cualquier forma de un vector de «ADN desnudo» y similares. Un «vector» comprende un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir transitoriamente o de forma permanente una célula. Se reconocerá que un vector puede ser un ácido nucleico desnudo, o un ácido nucleico formando un complejo con proteínas o lípidos. El vector comprende opcionalmente ácidos nucleicos y/o proteínas víricos o bacterianos, y/o membranas (p. ej., una membrana celular, envoltura lipídica de virus, etc.). Los vectores incluyen, pero sin limitarse a ellos, replicones (p. ej., replicones de ARN (véase el ejemplo 2 que se describe más adelante), bacteriófagos) a cuyos fragmentos de ADN se puede unir y replicarse. Así pues, los vectores incluyen, pero sin limitarse a ellos, ARN, ADN o ARN circular o lineal autorreplicante y autónomo, p. ej., plásmidos, virus y similares (patente de los EE.UU. n.º 5.217.879) e incluye plásmidos de expresión y que no son de expresión. Cuando un microorganismo o cultivo celular recombinante se dice que hospeda un «vector de expresión», esto incluye tanto el ADN circular y lineal extracromosómico como el ADN que se ha incorporado en el cromosoma o cromosomas del hospedador. Cuando una célula hospedadora se mantiene dentro un vector, el vector puede o bien replicarse de forma estable en las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o bien incorporarse dentro del genoma del hospedador.

- 35 La terminología «unido químicamente» se refiere a cualquier unión química de dos restos, p. ej., cuando un polipéptido de chaperona del RE está unido químicamente a un péptido antigénico. Tal unión química incluye los enlaces peptídicos de una proteína de fusión generada *in vivo* o por técnicas recombinantes.

- La terminología polipéptido o proteína «quimérica» o «de fusión» se refiere a una composición que comprende al menos una secuencia o dominio peptídico o polipeptídico que está asociada a un segundo dominio polipeptídico o peptídico. Una realización de esta invención es una molécula de ácido nucleico recombinante o aislada que codifica una proteína de fusión que comprende al menos dos dominios, en donde el primer dominio comprende la chaperona del retículo endoplasmático, CRT, y el segundo dominio comprende un epítipo antigénico, p. ej., un epítipo de péptido que se une al CMH de clase I. Los demás dominios pueden comprender un polipéptido, péptido, polisacárido o similares. La «fusión» puede ser una asociación generada por un enlace peptídico, una unión química, una interacción entre cargas (p. ej., atracciones electrostáticas, tales como puentes salinos, puentes de H, etc.) o similares. Si los polipéptidos son recombinantes, la «proteína de fusión» se puede traducir a partir de un mensajero común. Otra posibilidad es que las composiciones de los dominios se pueden unir mediante algún medio químico o electrostático. Las moléculas quiméricas (p. ej., proteínas de fusión entre péptidos de unión a la clase I y la CRT) pueden también incluir secuencias adicionales, p. ej., conectores, etiquetas de epítipos, secuencias de reconocimiento de cortes enzimáticos, secuencias señal, señales de secreción y similares. Otra posibilidad es que un péptido puede estar unido a un vehículo simplemente para facilitar la manipulación o identificación/localización del péptido.

- La terminología «inmunógeno» o «composición inmunógena» se refiere a un compuesto o composición que comprende un péptido, polipéptido o proteína que es «inmunógeno», a saber, capaz de desencadenar, aumentar o potenciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, bien sola o en combinación o unida o fusionada a otra sustancia. Una composición inmunógena puede ser un péptido de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, un péptido de 10 aminoácidos de longitud, un fragmento de 15 aminoácidos de longitud, un fragmento de 20 aminoácidos de longitud o más grande; los inmunógenos más pequeños pueden requerir la presencia de un polipéptido de «vehículo», p. ej., como una proteína de fusión, agregado, conjugado o mezcla, preferiblemente unido (químicamente o de otra manera) al inmunógeno. El inmunógeno puede expresarse de forma recombinante desde un vector de vacuna, que puede ser ADN desnudo que comprende la secuencia codificante del inmunógeno operativamente unida a un promotor, p. ej., un casete de expresión. El inmunógeno incluye uno o varios

determinantes antigénicos o epítomos que pueden variar de tamaño desde aproximadamente 3 a aproximadamente 15 aminoácidos.

La terminología «aislado», tal y como se utiliza en la presente memoria, cuando se refiere a una molécula o composición, tal como, p. ej., un ácido nucleico o polipéptido de CRT, significa que la molécula o composición está separada de al menos otro compuesto, tal como una proteína, otros ácidos nucleicos (p. ej., ARN) u otros contaminantes con el cual se asocia *in vivo* en su estado natural. Así pues, una composición de CRT se considera aislada cuando se ha aislado de cualquier otro componente con el cual está asociada de forma nativa, p. ej., membrana celular, como en un extracto celular. Sin embargo, una composición aislada puede ser sustancialmente pura. Una composición aislada puede estar en un estado homogéneo y puede estar seca o en una solución acuosa. La pureza y la homogeneidad se pueden determinar, por ejemplo, con técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) o cromatografía líquida de gran resolución (HPLC). Así pues, las composiciones aisladas de esta invención no contienen los materiales asociados normalmente con su entorno *in situ*. Incluso cuando una proteína se ha aislado como una banda homogénea o dominante, hay restos insignificantes de contaminantes que se copurifican con la proteína deseada.

La frase «el polipéptido E7 del VPH-16 no es oncogénico» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una variante (p. ej., delección, sustitución y similares) del polipéptido E7 del VPH-16 que no se fija al polipéptido del retinoblastoma (pRB) o que se fija a pRB con tan poca afinidad que la variante del polipéptido E7 del VPH-16 no es sustancialmente oncogénica. Los polipéptidos del VPH, entre ellos el polipéptido E7 del VPH-16, están bien descritos en la técnica; para el E7 del VPH-16, el n.º de acceso a GenBank AF125673 (1 de junio de 1999) muestra el genoma completo del VPH-16 y la proteína E7 del VPH-16.

La terminología «polipéptido», «proteína» y «péptido» incluyen composiciones de la invención que también incluyen «análogos», o «variantes conservativas» e «imitadores» o «peptidomiméticos» con estructuras y actividad que se corresponden sustancialmente con el polipéptido del cual procede la variante, entre ellos, p. ej., la CRT humana o el epítomo del péptido que se fija a la clase I, como el polipéptido E7 del VPH-16 E7, como se explica con detalle más adelante.

La terminología «composición farmacéutica» se refiere a una composición adecuada para el uso farmacéutico, p. ej., como una vacuna, en un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de esta invención son formulaciones que comprenden una cantidad farmacológicamente eficaz de una composición que comprende, p. ej., un ácido nucleico, o vector, o célula de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La terminología «promotor» es un ordenamiento de secuencias de control nucleotídicas que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de la polimerasa de tipo II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos represores o potenciadores distales que pueden estar localizados hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor «constitutivo» es un promotor que es activo en la mayoría de condiciones de desarrollo y medioambientales. Un promotor «inducible» es un promotor que está sometido a regulación por desarrollo y medioambiental. Un promotor «específico del tejido» es activo en determinados tipos de tejido de un organismo, pero no en otros tipos de tejido del mismo organismo. La terminología «operativamente unido» se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, o conjunto de sitios de fijación de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

La terminología «recombinante» se refiere a (1) un polinucleótido sintetizado o por lo demás manipulado *in vitro* (p. ej., «polinucleótido recombinante»), (2) procedimientos para utilizar polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en las células o en otros sistemas biológicos, o (3) un polipéptido («proteína recombinante») codificado por un polinucleótido recombinante. Por ejemplo, la CRT recombinante o un epítomo de péptido que se fija al CMH de clase I puede ser recombinante tal y como se utiliza para poner en práctica esta invención. Los «medios recombinantes» también abarcan la ligación de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones o dominios codificantes o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete o vector de expresión para la expresión de, p. ej., la expresión inducible o constitutiva de las secuencias codificantes polipeptídicas en los vectores utilizados para poner en práctica esta invención.

La terminología «replicón de ARN autorreplicante» se refiere a las construcciones basadas en los virus de ARN, p. ej., ARN del genoma de alfavirus (p. ej., virus de Sindbis, virus de la selva del Semliki, etc.), que se han manipulado genéticamente para permitir la expresión de ARN y proteínas heterólogos. Estos vectores recombinantes son autorreplicantes (a saber, son «replicones») y se pueden introducir en las células como ARN o ADN desnudo, tal y como se describe en detalle más adelante. En una realización, el replicón de ARN autorreplicante comprende un vector SINrep5 de ARN autorreplicante del virus de Sindbis, que se describe detalladamente en la patente de los EE.UU. n.º 5.217.879.

La terminología «administración sistémica» se refiere a la administración de una composición o agente tal como la vacuna molecular o la proteína de fusión del epítomo del péptido que se une a la clase I unido a la CRT descrita en la

presente memoria, de una manera que da lugar a la introducción de la composición en el sistema circulatorio del sujeto. La terminología administración «regional» se refiere a la administración de una composición en un espacio anatómico específico, tal como intraperitoneal, intratecal, subdural o en un órgano concreto, y similares. Por ejemplo, la administración regional incluye la administración de la composición o del fármaco en la arteria hepática. La terminología «administración local» se refiere a la administración de una composición o fármaco en un espacio anatómico limitado o circunscrito, tal como inyección intratumoral en una masa tumoral, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares y similares. Cualquier experto en la técnica sabrá que la administración local o la administración regional también puede dar lugar a la entrada de la composición o del fármaco en el aparato circulatorio.

La «tapasina» es el polipéptido de chaperona del RE conocido, tal y como se explicó anteriormente. Aunque no está limitado por ningún mecanismo de acción particular, *in vivo*, la tapasina es una subunidad del complejo TAP (transportador asociado al procesamiento de antígenos) y se fija tanto a los polipéptidos de TAP1 como del CMH de clase I. Los polipéptidos de la tapasina, y los equivalentes y análogos de los mismos, son especies del género de los polipéptidos de chaperonas del RE, tal y como se describe en la presente memoria (Barnden (2000) *J. Immunol.* 165: 322-330; Li (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 1581-1586).

Generación y manipulación de los ácidos nucleicos

La invención da a conocer la administración de ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión de la CRT con el péptido que se fija al epítipo de clase I, según se describe más arriba. Las proteínas de fusión recombinantes que contienen la CRT se pueden sintetizar *in vitro* o *in vivo*. Los ácidos nucleicos que codifican estas composiciones pueden estar en forma de «ADN desnudo» o se pueden incorporar en plásmidos, vectores, virus recombinantes (p. ej., «replicones») y similares para la administración *in vivo* o *ex vivo*. Los ácidos nucleicos y vectores de la invención se pueden construir y expresarse *in vitro* o *in vivo*, y se pueden utilizar muchos medios diferentes para fabricar y expresar estos genes y vectores. El experto en la técnica reconocerá que la actividad del gen deseado se puede obtener mediante la modulación de la expresión o de la actividad de los genes y ácidos nucleicos (p. ej., promotores) dentro de los vectores utilizados para poner en práctica la invención. Para esta invención se puede utilizar cualquiera de los procedimientos conocidos que se han descrito para incrementar o disminuir la expresión o actividad, o especificidad de tejido, de los genes. La invención se puede poner en práctica a la vez que cualquier procedimiento o protocolo conocido en la técnica, que se describen bien en la bibliografía científica y de patentes.

Técnicas generales

Las secuencias de ácido nucleico utilizadas para poner en práctica esta invención, bien sea ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus recombinantes o híbridos de los mismos, se pueden aislar de muy distintas fuentes, manipularse genéticamente, amplificarse y/o expresarse con técnicas recombinantes. Se puede utilizar cualquier sistema de expresión recombinante, entre ellos, además de las células bacterianas, p. ej., sistemas de expresión en células de mamífero, de levadura, de insecto o de plantas. Otra posibilidad es que estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe en, p. ej., Carruthers (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47: 411-418; Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105: 661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19: 373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33: 7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22: 1859; patente de los EE.UU. n.º 4.458.066. Los fragmentos de ADN bicatenarios pueden obtenerse luego bien por síntesis de la hebra complementaria e hibridando las hebras en las condiciones apropiadas, o bien con la adición de la hebra complementaria mediante la ADN polimerasa con una secuencia cebadora adecuada.

Las secuencias de la CRT, entre ellas la CRT humana, se conocen bien en la técnica (McCauliffe (1990) *J. Clin. Invest.* 86: 332-335; Burns (1994) *Nature* 367: 476-480; Coppolino (1998) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 553-558). La secuencia de ácido nucleico aparece como el n.º de acceso de GenBank NM 004343.

```

1      gtccgtactg cagagccgct gccggagggt cgttttaaag ggccgcggtg ccgccccctc
61     ggcccgccat gctgctatcc gtgccgctgc tgetcggcct cctcggcctg gccgtcgccg
121    agcccgcgct ctacttcaag gagcagtttc tggacggaga cgggtggact tcccgctgga
181    tcgaatccaa acacaagtca gattttggca aattcgttct cagttccggc aagttctacg
241    gtgacgagga gaaagataaa ggtttgcaga caagccagga tgcacgcttt tatgctctgt
301    cggccagttt cgagcctttc agcaacaaag gccagacgct ggtggtgcag ttcacggtga

```

```

361 aacatgagca gaacatcgac tgtgggggcg gctatgtgaa gctgtttcct aatagtttgg
421 accagacaga catgcacgga gactcagaat acaacatcat gtttggtccc gacatctgtg
481 gccctggcac caagaaggtt catgtcatct tcaactacaa gggcaagaac gtgctgatca
541 acaaggacat ccgttgcaag gatgatgagt ttacacacct gtacacactg attgtgctggc
601 cagacaacac ctatgaggtg aagattgaca acagccaggt ggagtccggc tccttgggaag
661 acgattggga cttcctgccca cccaaggaaga taaaggatcc tgatgcttca aaaccggaag
721 actgggatga gcggggccaag atcgatgatc ccacagactc caagcctgag gactgggaca
781 agcccagaca tatccctgac cctgatgcta agaagcccgga ggactgggat gaagagatgg
841 acggagagtg ggaaccccca gtgattcaga accctgagta caagggtgag tggaagcccc
901 ggcagatcga caaccagat tacaagggca cttggatcca cccagaaatt gacaaccccc
961 agtattctcc cgatcccagt atctatgcct atgataactt tggcgtgctg ggcctggacc
1021 tctggcaggt caagtctggc accatctttg acaacttcct catcaccaac gatgaggcat
1081 acgctgagga gtttggaac gagacgtggg gcgtaacaaa ggcagcagag aaacaaatga
1141 aggacaaaca ggacgaggag cagaggctta aggaggagga agaagacaag aaacgcaaag
1201 aggaggagga ggcagaggac aaggaggatg atgaggacaa agatgaggat gaggaggatg
1261 aggaggacaa ggaaggaagat gaggagggaag atgtccccgg ccaggccaag gacgagctgt
1321 agagaggcct gcctccaggg ctggactgag gcctgagcgc tcctgcccga gagcttgccg
1381 cgccaaataa tgtctctgtg agactcgaga actttcattt ttttccaggc tgggtcggat
1441 ttgggggtgga ttttggtttt gttccccctcc tccactctcc cccacccctc ccccgccctt
1501 tttttttttt tttttaaaact ggtattttat cctttgatcc tccttcagcc ctcacccctg
1561 gttctcatct ttcttgatca acatcttttc ttgcctctgt gccccttctc tcatctctta
1621 gctcccctcc aacctggggg gcagtgggtg ggagaagcca caggcctgag atttcatctg
1681 ctctccttcc tggagcccag aggaggggcag cagaaggggg tgggtgtctc aacccccag
1741 cactgaggaa gaacggggct cttctcattt caccctctcc tttctccctt gccccagga
1801 ctggggcact tctgggtggg gcagtgggtc ccagattggc tcacactgag aatgtaagaa
1861 ctacaaacaa aatttctatt aaattaaatt ttgtgtctc 1899

```

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, p. ej., generación de mutaciones en las secuencias, subclonación, sondas de marcación, secuenciación, hibridación y similares, se describen bien en la bibliografía científica y de patentes. Véase, p. ej., Sambrook, de., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); *Current protocols in Molecular Biology*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1997); *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte 1, Tijssen, ed. Elsevier, N. Y. (1993).

Los ácidos nucleicos, vectores, cápsidas, polipéptidos y similares se pueden analizar y cuantificar mediante cualquiera de una serie de medios generales bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, p. ej., procedimientos bioquímicos analíticos tales como RMN, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de gran resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC, por su nombre en inglés) y cromatografía de hiperdifusión, distintos procedimientos inmunitarios, p. ej., reacciones de precipitina líquida o en gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIA, por su nombre en inglés), inmunoensayos enzimáticos (ELISA, por su nombre en inglés), ensayos inmunofluorescentes, análisis por transferencia Southern, análisis por transferencia Northern, análisis por transferencia puntiforme, electroforesis en gel (p. ej., SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cuantitativa, otros procedimientos de amplificación del ácido nucleico o de la diana o de la señal, radiomarcación, recuento de centelleo y cromatografía de afinidad.

Amplificación de ácidos nucleicos

Los cebadores oligonucleotídicos se pueden utilizar para amplificar los ácidos nucleicos para generar las secuencias que codifican las proteínas de fusión utilizadas para poner en práctica la invención, para monitorizar la concentración de la vacuna tras la administración *in vivo* (p. ej., cantidad de un plásmido o virus), para confirmar la presencia y fenotipo de los LTC activados, y similares. El experto en la técnica puede seleccionar y diseñar cebadores oligonucleotídicos para amplificación adecuados a partir de las secuencias conocidas. Los procedimientos de amplificación también se conocen bien en la técnica e incluyen, p. ej., reacción en cadena de la polimerasa, PCR (*PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y *PCR Strategies* (1995), ed. Innis, Academic Press, N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR, por su nombre en inglés) (Wu (1989) *Genomics* 4: 560; Landegren (1988) *Science* 241: 1077; Barringer (1990) *Gene* 89: 117); amplificación de la transcripción (Kwoh (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173); y replicación de secuencias automantenida (Guatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874); amplificación con la replicasa Q β (Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35: 1477-1491; Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10: 257-271) y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario; Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 307-316; patentes de los EE.UU. n.º 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) *Biotechnology* 13: 563-564).

Clonación y construcción de los casetes de expresión

Los casetes de expresión, entre ellos los plásmidos, virus recombinantes (p. ej., virus de ARN como los replicones que se describen más adelante) y otros vectores que codifican las proteínas de fusión descritas en la presente

memoria se utilizan para expresar estos polipéptidos *in vitro* e *in vivo*. Los ácidos nucleicos recombinantes se expresan mediante muy diversas técnicas convencionales (Roberts (1987) *Nature* 328: 731; Schneider (1995) *Protein Expr. Purif.* 6:435-10; Sambrook, véase más arriba; Tijssen, véase más arriba; Ausubel, véase más arriba). Los plásmidos, los vectores, etc., se pueden aislar de fuentes naturales, obtenidas de fuentes tales como las colecciones de la ATCC o del GenBank, o prepararse mediante procedimientos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos utilizados para poner en práctica la invención se pueden expresar de forma estable o transitoria en las células, tales como los sistemas de expresión episómico. Los marcadores de selección se pueden incorporar para conferir un fenotipo seleccionable en las células transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar el mantenimiento episómico y la replicación de tal forma que no se requiere la integración en el genoma del hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar una resistencia a antibiótico, p. ej., cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, para permitir la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (Blondelet-Rouault (1997) *Gene* 190: 315-317; Aubrecht (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 992-997).

Administración de ácidos nucleicos *in vivo*

En una realización, los ácidos nucleicos que codifican la CRT unida a los epítomos de péptidos que se fijan a la clase I se clonan en casetes de expresión tales como plásmidos u otros vectores, virus que pueden transfectar o infectar las células *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*. Se conocen una serie de técnicas de introducción, entre ellas la introducción del gen basada en lípidos o liposomas (Mannino (1988) *BioTechniques* 6: 682-691; patente de los EE.UU. n.º 5.279.833), vectores retrovíricos de replicación defectuosa con la secuencia exógena deseada como parte del genoma retrovírico (Miller (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 4239; Kolberg (1992) *J. NIH Res.* 4:43; Cometta (1991) *Hum. Gene Ther.* 2: 215; Zhang (1996) *Cancer Metastasis Rev.* 15: 385-401; Anderson, *Science* (1992) 256: 808-813; Nabel (1993) *TIBTECH* 11: 211-217; Mitani (1993) *TIBTECH* 11: 162-166; Mulligan (1993) *Science*, 926-932; Dillon (1993) *TIBTECH* 11: 167-175; Miller (1992) *Nature* 357: 455-460).

Los casetes de expresión también pueden proceder de genomas víricos. Los vectores que pueden emplearse incluyen virus de ADN o ARN envueltos o sin envolver modificados con técnicas recombinantes, ejemplos de los cuales son *baculoviridae*, *parvoviridae*, *picornoviridae*, *herpesviridae*, *poxviridae*, *adenoviridae*, *picornaviridae* o *alphaviridae*. También pueden emplearse vectores quiméricos que explotan los méritos ventajosos de cada una de las propiedades del vector del que deriva (Feng (1997) *Nature Biotechnology* 15: 866-870). Tales genomas víricos se pueden modificar mediante técnicas de ADN recombinante para incluir el gen de interés y se pueden manipular genéticamente para que sean de replicación deficiente, de replicación condicional o capaces de replicarse. Los vectores pueden proceder de genomas adenovíricos, de virus adenoasociados o retrovíricos. Los vectores retrovíricos pueden incluir los basados en el virus de la leucemia murina (MuLV, por su nombre en inglés), virus de la leucemia del mono gibbon (GaLV, por su nombre en inglés), virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (Buchscher (1992) *J. Virol.* 66 (5): 2731-2739; Johann (1992) *J. Virol.* 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt (1990) *Virol.* 176: 58-59; Wilson (1989) *J. Virol.* 63: 2374-2378; Miller (1991) *J. Virol.* 65: 2220-2224). Los vectores basados en virus adenoasociados (VAA) pueden transducir las células para la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y se pueden usar en procedimientos de tratamiento *in vivo* y *ex vivo* (Okada (1996) *Gene Ther.* 3: 957-964; West (1987) *Virology* 160: 38-47; Carter (1989), patente de los EE.UU. n.º 4.797.368; Carter et al., patente internacional WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801; Muzyczka (1994) *J Clin. Invest.* 94: 1351).

Administración *in vivo* con replicones de ARN autorreplicante

Además de los vectores de expresión descritos más arriba y de los virus recombinantes, los replicones de ARN autorreplicantes también se pueden utilizar para infectar células o tejidos u organismos enteros con ácidos nucleicos que expresan la proteína de fusión de la invención. Así pues, la invención también incorpora virus de ARN, entre ellos ARN de genoma de alfavirus tales como el virus de Sindbis, el virus de la selva del Semliki, el virus de la encefalitis equina venezolana, y similares, que se han manipulado genéticamente para permitir la expresión de ARN y proteínas heterólogas. Cuando los genes estructurales víricos se reemplazan por las secuencias codificantes heterólogas se consiguen niveles elevados de expresión de las secuencias heterólogas, tales como los polipéptidos de fusión de la invención.

Estos ARN recombinantes son autorreplicantes («replicones») y se pueden introducir en las células como ARN o ADN desnudo. Sin embargo, requieren la complementación en *trans* para empaquetarse y liberarse de las células como partículas de viriones infecciosos. Los ARN cooperadores defectuosos contienen las secuencias de acción en *cis* requeridas para la replicación, así como un promotor de ARN que promueve la expresión de marcos abiertos de lectura. En las células cotransfectadas con el replicón y los ARN cooperadores defectuosos, las proteínas no estructurales víricas que se traducen desde el ARN del replicón permiten que el ARN cooperador defectuoso se replique y se transcriba para producir las proteínas estructurales del virión (Bredenbeek (1993) *J. Virol.* 67: 6439-6446).

Las vacunas con el replicón de ARN pueden proceder de vectores de alfavirus, tales como los vectores del virus de Sindbis (familia *Togaviridae*) (Xiong (1989) *Science* 243: 1188-1191), del virus de la selva del Semliki (Ying (1999)

Nat. Med. 5: 823-827) o del virus de la encefalitis equina venezolana (Pushko (1997) *Virology* 239: 389-401). Estas vacunas son autorreplicantes y autolimitantes, y se pueden administrar como ARN o como ADN, que a continuación se transcribe en replicones de ARN en las células transfectadas o *in vivo* (Berglund (1998) *Nat. Biotechnol.* 16: 562-565). El ARN autorreplicante infecta un amplio abanico de tipos celulares y permite que se exprese una gran cantidad del antígeno de interés (Huang (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 531-535). Adicionalmente, el ARN autorreplicante acaba provocando la lisis de las células transfectadas porque la replicación del virus es tóxica para las células hospedadoras infectadas (Frolov (1996) *J. Virol.* 70: 1182-1190). Estos vectores, por tanto, no suscitan los problemas asociados a las vacunas con ADN desnudo relacionados con la integración en el genoma del hospedador. Esto es particularmente importante para el desarrollo de vacunas que actúen selectivamente sobre las proteínas que son potencialmente oncogénicas, tales como la proteína E7 adenovírica.

En una realización, el replicón de ARN autorreplicante comprende el vector de ARN autorreplicante del virus de Sindbis SINrep5, tal y como describen con detalle Bredenbeek, véase más arriba, y Herrmann (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 524-531.

Polipéptidos

En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica un polipéptido de fusión que comprende al menos dos dominios, en donde el primer dominio comprende un polipéptido de calreticulina (CRT); y, en donde el segundo dominio comprende un epítipo de péptido que se fija al CMH de clase I. Tal y como se indicó anteriormente, la terminología «polipéptido», «proteína» y «péptido» se refieren a los polipéptidos que incluyen la CRT, fragmentos de la CRT que se fijan a péptidos, y epítopos de péptidos que se fijan al CMH de clase I, utilizados para poner en práctica la invención, incluyen composiciones de la invención que también incluyen «análogos» o «variantes conservativas» e «imitadores» o «peptidomiméticos» con estructuras y actividad que sustancialmente corresponden a la CRT y a epítopos de péptidos que se fijan al CMH de clase I. Así pues, la terminología «variante conservativa» o «análogo» o «imitador» también se refieren a un polipéptido o péptido que tiene una secuencia aminoacídica modificada, de tal forma que el cambio o cambios no alteran sustancialmente la estructura y/o actividad (capacidad para unirse a péptidos «antigénicos», para estimular una respuesta inmunitaria) del polipéptido (de la variante conservativa). Estos incluyen variaciones modificadas conservativamente de una secuencia aminoacídica, a saber, sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones de esos restos que no son decisivos para la actividad de la proteína, o sustitución de aminoácidos con restos que tienen propiedades similares (ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.) de tal forma que las sustituciones de aminoácidos incluso decisivos no alteran sustancialmente ni la estructura ni la actividad. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan los aminoácidos similares desde el punto de vista funcional se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una guía de ejemplo para seleccionar sustituciones conservativas incluye (resto original/sustitución): Ala/Gly o Ser, Arg/Lys; Asn/Gln o His; Asp/Glu; Cys/Ser; Gln/Asn; Gly/Asp; Gly/Ala o Pro; His/Asn o Gln; Ile/Leu o Val; Leu/Ile o Val; Lys/Arg o Gln o Glu; Met/Leu o Tyr o Ile; Phe/Met o Leu o Tyr; Ser/Thr; Thr/Ser; Trp/Tyr, Tyr/Trp o Phe; Val/Ile o Leu.

Una guía de ejemplo alternativa utiliza los grupos mostrados en la tabla que viene a continuación. Para una descripción detallada de la química y estructura de las proteínas, véase Schulz, G. E. et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, Nueva York, 1978 y Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. Los tipos de sustituciones que pueden realizarse en los polipéptidos se pueden basar en el análisis de las frecuencias de cambios de aminoácidos entre una proteína homóloga de diferentes especies, definidas en la presente memoria como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

1	Restos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares	Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2	Restos polares, cargados negativamente y sus amidas	Asp, Asn, Glu, Gln;
3	Restos polares cargados positivamente	His, Arg, Lys;
4	Restos no polares alifáticos grandes	Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5	Restos aromáticos grandes	Phe, Tyr, Trp

Los tres restos aminoacídicos anteriores entre paréntesis tienen funciones especiales en la arquitectura de las proteínas. La Gly es el único resto que carece de una cadena lateral y, así pues, confiere flexibilidad a la cadena. La Pro, debido a su geometría inusual, constriñe fuertemente la cadena. La Cys puede participar en la formación de puentes disulfuro, que es importante para el plegamiento de las proteínas.

Los cambios más sustanciales de las propiedades bioquímicas, funcionales (o inmunitarias) se realizan mediante la selección de sustituciones que son menos conservativas, tal como entre los cinco grupos de arriba, en vez de dentro de ellos. Tales cambios diferirán más significativamente por su efecto a la hora de mantener (a) la estructura del

esqueleto peptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal; (b) la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Ejemplos de tales sustituciones son (i) la sustitución de Gly y/o Pro por otro aminoácido o delección o inserción de Gly o Pro; (ii) sustitución de un resto hidrófilo, p. ej., Ser o Thr, por un resto hidrófobo, p. ej., Leu, Ile, Phe, Val o Ala (y lo contrario); (iii) sustitución de un resto de Cys por cualquier otro resto (y lo contrario); (iv) sustitución de un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., Lys, Arg o His, por un resto que tiene una carga electronegativa, p. ej., Glu o Asp, (y lo contrario) o (v) sustitución de un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., Phe, por un resto que no tiene tal cadena lateral, p. ej., Gly (y lo contrario).

El experto en la técnica apreciará que las sustituciones identificadas anteriormente no son sólo las únicas sustituciones conservativas posibles. Por ejemplo, para algunos propósitos, todos los aminoácidos cargados se pueden considerar sustituciones conservativas entre sí, tanto si son positivas como si son negativas. Las sustituciones, delecciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también se puede considerar que produce «variantes modificadas de forma conservativa».

La terminología «imitador» y «peptidomimético» se refiere a un compuesto químico sintético que tiene las características estructurales y/o funcionales necesarias de un péptido, tal como imitar la CRT en interacción con péptidos y las proteínas de clase I del CMH. El imitador puede estar completamente compuesto de análogos no naturales sintéticos de aminoácidos, o ser una combinación de una parte de aminoácidos naturales y una parte de análogos no naturales. El imitador también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre y cuando tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad de los imitadores. Al igual que con las variantes conservativas, la experimentación convencional determinará si un imitador se encuentra dentro del alcance de la invención, que su estructura estereoquímica y/o su función no están sustancialmente alteradas. Los imitadores de péptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales «no naturales», típicamente de tres grupos: (a) los grupos de unión de restos diferentes al enlace amida natural («enlace peptídico»); (b) restos no naturales en lugar de aminoácidos que se producen de forma natural; o (c) restos que inducen o estabilizan una estructura secundaria, p. ej., una conformación de giro β , giro γ , hoja β o hélice α . Un polipéptido se puede calificar de imitador cuando todos o algunos de sus restos están unidos mediante enlaces químicos diferentes a los enlaces peptídicos. Los restos peptidomiméticos individuales se pueden unir mediante enlaces peptídicos, y otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-dicitlohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de unión que son alternativas a los enlaces peptídicos incluyen cetometileno ($-(C(=O)-CH_2-$ para $-C(=O)-NH-$), aminometileno (CH_2-NH), etileno, olefina ($CH=CH$), éter (CH_2-O), tioéter (CH_2-S), tetrazol (CN_4), tiazol, retroamida, tioamida o éster (Spatola (1983) en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, vol. 7, páginas 267-357, *Peptide Backbone Modifications*, Marcell Dekker, NY).

La estructura de los polipéptidos, péptidos, otros derivados funcionales, entre ellos los imitadores, se basan preferiblemente en la estructura y secuencia de aminoácidos de la CRT, preferiblemente de la CRT humana (McCauliffe (1990) *J. Clin. Invest.* 86: 332-335; Bums (1994) *Nature* 367: 476-480; Coppolino (1998) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30: 553-558). La proteína CRT humana (n.º de acceso de GenBank NM 004343) se muestra a continuación:

```

1  MLLSVPLLLG LLGLAVAEPA VYFKEQFLDG DGWTSRWIES KHKSDFGKFV LSSGKFYGDE
61  EKDKGLQTSQ DARFYALSAS FEPFSNKGQT LVVQFTVKHE QNIDCGGGYV KLFPSNSLDQT
121 DMHGDSEYNI MFGPDICGPG TKKVHVIFNY KGKNVLINKD IRCKDEFTH LYTLIVRPDN
181 TYEVKIDNSQ VESGSLEDDW DFLPPKKIKD PDASKPEDWD ERAKIDDDPTD SKPEDWDKPE
241 HIPDPDAKKP EDWDEEMDGE WEPPVIQNP EYKGEWKPRQI DNPDYKGTWI HPEIDNPEYS
301 PDPSIYAYDN FGVLGDLWLQ VKSGTIFDNF LITNDEAYAE EFGNETWGVV KAAEQMKDK
361 QDEEQRLKEE EEDKKRKEEE EAEDKEDDED KDEDEDEED KEEDEEEDVP GQAKDEL 417

```

Los restos sintéticos individuales y los polipéptidos que incorporan imitadores se pueden sintetizar mediante muy diversos procedimientos y metodologías bien conocidos en la técnica, p. ej., *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman et al. (eds) John Wiley & Sons, Inc., NY. Los polipéptidos que incorporan imitadores también se pueden fabricar con procedimientos sintéticos en fase sólida (p. ej., patente de los EE.UU. n.º 5.422.426). Los péptidos y los imitadores peptídicos también pueden sintetizarse con metodologías combinatorias. Se conocen bien diferentes técnicas para generar colecciones de péptidos y peptidomiméticos, p. ej., multipina, bolsa del té y técnicas de división-conjugación-mezcla (al-Obeidi (1998) *Mol. Biotechnol.* 9: 205-223; Hruby (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 114-119; Ostergaard (1997) *Mol. Divers.* 3: 17-27; Ostresh (1996) *Methods Enzymol.* 267: 220-234). Los péptidos y polipéptidos modificados se puede producir adicionalmente mediante modificación química (Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19: 373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33: 7886-7896).

Los péptidos también pueden sintetizarse, completamente o en parte, mediante síntesis química convencional (Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232; Banga, A. K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic

Publishing Co., Lancaster, PA). Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse con diferentes técnicas de fase sólida (Roberge (1995) *Science* 269: 202; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289: 3-13) y síntesis automática, p. ej., con el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En una realización se utilizan fragmentos de unión a péptidos o «subsecuencias» de la CRT. En otra realización se utilizan otros péptidos que se fijan a las proteínas del CMH, preferiblemente a las proteínas del CMH de clase I. Tales péptidos pueden proceder de cualquier polipéptido, en particular, de un patógeno conocido, o puede ser completamente sintético. Los procedimientos para determinar si un péptido se fija a una CRT o a un fragmento de CRT, o a una proteína del CMH, y con qué fuerza, son de uso corriente en la técnica (Jensen (1999) *Immunol. Rev.* 172: 229-238; Zhang (1998) *J. Mol. Biol.* 281: 939-947; Morgan (1997) *Protein Sci* 6: 1771-1773; Fugger (1996) *Mol. Med.* 2: 181-iso; Sette (1994) *Mol. Immunol.* 31: 513-822; Elvin (1993) *J. Immunol. Methods* 158: 161-171; patentes de los EE.UU. n.º 6.048.530; 6.037.135; 6.033.669; 6.007.820).

Formulación y administración de las composiciones farmacéuticas

En distintas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos, los casetes de expresión, las células y las partículas son para ser administradas a un individuo como composiciones farmacológicas en cantidades suficientes para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (p. ej., una repuesta del LTC, véase el ejemplo que se describe más adelante) en el individuo.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables y las formulaciones para los ácidos nucleicos son conocidos por el experto en la técnica y se describen con detalle en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., la última edición de *Remington's Pharmaceutical Science*, Maack Publishing Company, Easton, PA («el Remington»); Banga; Putney (1998) *Nat. Biotechnol.* 16: 153-157; Patton (1998) *Biotechniques* 16: 141-143; Edwards (1997) *Science* 276: 1868-1871; patentes de los EE.UU. n.º 5.780.131; 5.770.700; 5.770.201.

Los ácidos nucleicos utilizados en los procedimientos se pueden administrar solos o como composiciones farmacéuticas mediante cualquier medio conocido en la técnica, p. ej., de forma sistémica, regional o local; mediante administración intraarterial, intratecal (i.t.), intravenosa (i.v.), parenteral, en la cavidad intrapleural, tópica, oral o local, como por vía subcutánea, intratraqueal (p. ej., mediante aerosol) o transmucosa (p. ej., vestibular, vesical, vaginal, uterina, rectal, por la mucosa nasal). Los procedimientos reales para administrar las composiciones las conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica y se describen en detalle en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., el Remington.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquier protocolo y en una serie de formas de dosis unitarias según el procedimiento y la vía y la frecuencia de la administración, si se han de administrar otros fármacos, la respuesta del individuo, y similares. Las dosis para las composiciones farmacéuticas típicas con ácidos nucleicos, péptidos y polipéptidos las conocen bien los expertos en la técnica. Tales dosis se pueden ajustar en función de una serie de factores, p. ej., las respuestas iniciales (p. ej., número y actividad de los LTC inducidos, encogimiento del tumor y similares), el contexto terapéutico concreto, la salud y la tolerancia del paciente. La cantidad de la composición farmacéutica adecuada para inducir la respuesta deseada se define como una «dosis terapéuticamente eficaz». La pauta posológica y las cantidades eficaces para este uso, a saber, la «pauta posológica de dosificación» dependerá de una serie de factores, entre ellos, p. ej., las enfermedades o afecciones a tratar o prevenir mediante la inmunización, el estado general de la salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad, la formulación farmacéutica y la concentración de la composición farmacéutica, y similares. La pauta posológica de dosificación también tiene en cuenta la farmacocinética, a saber, la velocidad de absorción de la composición farmacéutica, la biodisponibilidad, el metabolismo, la eliminación y similares (Remington). Las dosis se pueden determinar empíricamente, p. ej., con el cálculo de la disminución o mejoría de los síntomas, o mediante criterios objetivos, p. ej., midiendo la cantidad de LTC específicos del antígeno. Como se observó anteriormente, se puede administrar una única administración o varias administraciones según la dosis y la frecuencia según lo requiera y tolere el paciente. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar solas o a la vez que otros tratamientos terapéuticos o como inmunización preventiva.

Tratamiento *ex vivo* y readministración de las CPA

En diferentes realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos de la invención se introducen en el individuo mediante el tratamiento *ex vivo* de las células presentadoras de antígeno (CPA), seguido de la administración de las CPA manipuladas. En una realización, las CPA se transducen (transfectan) o infectan con ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de la invención; después, las CPA se administran al individuo. En otra realización, las CPA se estimulan con un lisado de células de las células transfectadas y que expresan una proteína de fusión recombinante *in vivo*. Después de esta «sensibilización», las CPA se administran al individuo.

Las proteínas de fusión pueden estar en cualquier forma, p. ej., como polipéptidos purificados o sintéticos, como lisados celulares brutos (de células transfectadas que fabrican la proteína de fusión recombinante) y similares. La CPA puede ser una célula histocompatible con el CMH (una célula tipada según el tejido). La CPA puede ser una célula cultivada de tejido o puede ser una CPA aislada del individuo a tratar y readministrarse después de la estimulación *ex vivo*. Se puede utilizar cualquier CPA, según se describe anteriormente. Los procedimientos para

aislar las CPA, el tratamiento *ex vivo* en cultivo y la readministración se conocen bien en la técnica (patentes de los EE.UU. n.º 5.192.537; 5.665.350; 5.723.388; 5.888.705; 5.962.320; 6.017.527; 6.027.488).

Kits

5 Los kits para ser usados en la invención contienen las composiciones farmacéuticas de la invención, según se describe anteriormente, para poner en práctica la invención. Los kits pueden contener polipéptidos quiméricos recombinantes o sintéticos que comprenden un primer dominio que comprende un polipéptido de chaperona del RE y un segundo dominio que comprende un péptido antigénico, p. ej., una proteína de fusión de la CRT a epítopos peptídicos que se unen a la clase I; o los ácidos nucleicos que los codifican, p. ej., en forma de un ADN desnudo (p. ej., plásmidos), virus (p. ej., «replicones» procedentes de alfavirus, entre ellos replicones del virus de Sindbis) y similares. El kit puede contener material instructivo que enseñe las metodologías, p. ej., medios para administrar las composiciones para ser usadas de acuerdo con la invención, medios para inyectar o infectar células o pacientes o animales con los ácidos nucleicos de la invención, medios para monitorizar la respuesta inmunitaria resultante y valorar la reacción del individuo al que hay que administrar las composiciones, y similares.

15 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria sólo tienen propósitos ilustrativos y que a las personas expertas en la técnica se les ocurrirán distintas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y quedarán incluidas dentro de esta solicitud y del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar, y no para limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

20 La administración de CRT unida a epítopos peptídicos que se fijan a la clase I refuerzan la generación de una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos del antígeno

El siguiente ejemplo describe estudios que demuestran que las composiciones y los procedimientos de la invención son eficaces para mejorar las respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos de antígeno.

25 Estos estudios utilizaron una vacuna de ADN que comprende la secuencia que codifica la proteína de fusión que incluye la calreticulina (CRT) y un epítipo peptídico que se une al polipéptido de clase I, en donde el epítipo era un antígeno modelo, el polipéptido E7 del virus 16 del papiloma humano (E7 del VPH-16). Se evaluaron los efectos antitumorales mediados por las respuestas inmunitarias específicas de E7 y los efectos antiangiogénicos estimulados por la vacuna en los ratones vacunados, pues los ratones C57BL/6 que se vacunaron por vía intradérmica con vacuna de ADN que comprende el de la fusión quimérica de calreticulina y E7 (CRT/E7) mostraron un incremento considerable de los precursores de los linfocitos T CD8+ (LTC) específicos de E7, protección tumoral y tratamiento tumoral en comparación con las vacunas con ADN que contienen solo el gen de CRT o de E7 de tipo silvestre. Además, el tratamiento de los ratones C57BL/6 o de los ratones atímicos con bien ADN de CRT o bien ADN de la quimera CRT/E7 condujo a la reducción de los nódulos metastásicos de pulmón e inhibición de la angiogénesis dentro de los nódulos pulmonares. Estos resultados indican que la conexión del gen de CRT a un gen de antígeno puede realzar enormemente la potencia de las vacunas con ADN a la hora de desencadenar efectos antitumorales a través de un realce significativo de la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+ (LTC) específicos de antígenos y de los efectos antiangiogénicos.

40 Construcciones de ADN plasmídico y su preparación: la generación del plásmido pcDNA3 que expresa la E7 del VPH-16 se construyó como se describe en Chen (2000) *Cancer Res.* 60: 1035-1042; véase también Chen (2000) *Vaccine* 18: 2015-2022; Ji (1999) *Hum. Gene Ther.* 10: 2727-2740; Chen (1999) *Gene Ther.* 6: 1972-1981; Ji (1998) *Int. J. Cancer.* 78: 41-45. Véase también, p. ej., Seedorf (1987) *EMBO J.* 6: 139-144; patentes de los EE.UU. n.º 5.629.161; 5.501.947; 5.547.846; 5.180.806; 4.777.239. Véase el n.º de acceso de GenBank AF125673 (1 de junio de 1999) que describe el genoma completo del VPH-16 y la proteína E7 del VPH-16, que tiene la secuencia

**MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNI VTFCKCDST
LRLCVQSTHVDI RTLEDLLMGT LGIVCPICSQKP**

45 Para generar el plásmido que codifica la calreticulina completa de conejo (hay una homología de más del 90% entre la calreticulina de conejo, de humano, de ratón y de rata), pcDNA3-CRT, el fragmento de ADN que codifica esta proteína se amplificó primero por PCR con las condiciones que se describen en Chen (2000) *Cancer Res.*, véase más arriba, que utiliza como plantilla el ADNc de la calreticulina de conejo (Michalak (1999) *Biochem J.* 344 Pt 2: 281-292), proporcionado por el Dr. Marek Michalak, Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá y una pareja de cebadores: 5'-ccggtctagaatgctgctccctgtgccgt -3' y 5'-ccggagatctcagctgctcctggcctggc-3'. El producto amplificado se digirió luego con las enzimas de restricción XbaI y BamHI, y luego se clonó en los sitios de clonación de XbaI y BamHI del vector pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para generar el pcDNA3-CRT/E7, el ADN de E7 se amplificó por PCR con pcDNA3-E7 como ADN de molde y una pareja de cebadores: 5'-ggggaattcatggagatacaccta-3' y 5'-ggtggatccttgagaacagatgg-3'. A continuación, el fragmento de ADN de E7 amplificado se digirió con BamHI y luego se clonó en los sitios de clonación de BamHI del vector pcDNA3-CRT. La orientación y exactitud de estas

construcciones se confirmó por secuenciación del ADN.

El ADN plasmídico con la inserción del gen de CRT, E7 o CRT/E7, y el vector plasmídico «vacío» se transfectaron en las células DH5TM eficientes para subclonación (Life Technologies, EE.UU.). A continuación, el ADN se amplificó y se purificó con doble purificación de CsCl (BioServe Biotechnologies, Laurel, MD). La integridad del ADN plasmídico y la ausencia de ADN o ARN de *Escherichia coli* se comprobaron en cada preparación por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La concentración del ADN se determinó mediante la densidad óptica, medida a 260 nm. La presencia de inserción del fragmento de E7 se confirmó mediante la digestión con enzimas de restricción y la electroforesis en gel.

Líneas celulares: la producción y el mantenimiento de las células TC-1 se realizó como se describe en Lin (1996) *Cancer Res.* 56: 21-26. El día de la provocación tumoral se recogieron las células TC-1 por tripsinización, se lavaron dos veces con una solución salina tamponada de Hanks a 1X (HBSS, por su nombre en inglés) y, finalmente, se resuspendieron en HBSS a 1X a la concentración deseada para la inyección. El Dr. J. C. Yang (NCI, NIH, Bethesda, MD) proporcionó una línea celular 293 de riñón embrionario humano que expresa D^b y K^b (293 D^b, K^b) (Bloom (1997) *J. Exp. Med.* 185: 453-459). Se hizo crecer en el medio DMEM que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor al 10%, 0,3% de glutamina, 0,01 M de HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 µg de G418.

Ratones: las ratonas C57BL/6 hembra de 6 a 8 semanas de edad del National Cancer Institute (Frederick, MD) se compraron y se mantuvieron en el animalario de oncología del Johns Hopkins Hospital (Baltimore, MD). Para caracterizar el efecto antiangiogénico, se llevaron a cabo experimentos del tratamiento tumoral *in vivo* en ausencia de efectores inmunitarios con las ratonas de 6 semanas de edad BALB/c nu/nu del National Cancer Institute (Frederick, MD). Todos los procedimientos animales se realizaron de acuerdo con los protocolos autorizados y de acuerdo con las recomendaciones para el uso apropiado y el cuidado de los animales de laboratorio.

Vacunación con ADN: la preparación de partículas de oro revestidas con ADN y la vacunación con ADN mediada por partículas para transformación biolística se realizó con una disparador biolístico impulsado por helio (Bio-Rad, Hercules, CA) de acuerdo con lo descrito por Chen (2000) *Cancer Res.*, véase más arriba. Brevemente, las partículas de oro revestidas con ADN (1 o 4 µg de ADN/bala) se administraron a la región abdominal rasurada de los ratones mediante el disparador biolístico impulsado por helio con una presión de descarga de aproximadamente 400 p.s.i.

Rinción de citocinas intracitoplasmática y análisis por citometría de flujo: los esplenocitos de grupos de ratones vacunados o sin tratamiento previo se incubaron bien con el péptido de E7 (restos aminoacídicos (aa) 49 a 57) que contiene el epítipo para el CMH de clase I (Feltkamp (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 2242-2249) para detectar los precursores de los linfocitos T CD8+ específicos de E7 o el péptido de E7 (aa 30 a 67) que contiene el péptido del CMH de clase II (Tindle (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5887-5891) para detectar los precursores de los linfocitos T cooperadores CD4+ específicos de E7. El péptido de E7 se añadió a una concentración de 1 µg/ml para los aa 49 a 57 y de 10 µg/ml para los aa 30 a 67 durante 20 horas. Se añadió GolgistopTM (Pharmingen, San Diego, CA) 6 horas antes de recoger las células del cultivo. A continuación, las células se lavaron una vez en un tampón FACScanTM y se tiñeron con el anticuerpo monoclonal de rata contra CD8 o CD4 de ratón conjugado a ficoeritrina (PE, por su nombre en inglés) (Pharmingen, San Diego, CA). Las células se sometieron a la tinción de citocinas intracelulares con el kit Cytofix/CytopermTM de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pharmingen). Los anticuerpos anti-IL4 y anti-IFN-γ conjugados a FITC y el anticuerpo de control del isotipo de la inmunoglobulina (IgG1 de rata) se compraron a Pharmingen. El análisis por citometría de flujo se realizó en un FACScanTM de Becton Dickinson con el programa informático CELLQuestTM (sistema de inmunocitometría de Becton Dickinson, Mountain View, CA).

ELISA para el anticuerpo anti-E7: los anticuerpos anti-E7 del VPH-16 en el suero se determinaron mediante un ELISA directo tal y como se describe en Wu (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11671-11675. Brevemente, una placa de 96 micropocillos se revistió con 10,5 µg/ml de proteínas de E7 del VPH-16 procedentes de bacterias y se incubaron a 40°C durante una noche. A continuación, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía suero bovino fetal al 20%. Se prepararon sueros de los ratones el día 14 tras la inmunización, se diluyeron en serie en PBS a 1X, se añadieron a los pocillos de ELISA y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de lavar con PBS a 1X que contenía Tween-20 al 0,05%, la placa se incubó con una dilución de 1/2000 de un anticuerpo de conejo contra la IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA) a temperatura ambiente (TA) durante una hora. La placa se lavó 6 veces, se reveló con TMB (Pierce, Rockford, IL) y se detuvo con H₂SO₄ a 1 M. La placa de ELISA se leyó con un lector de ELISA estándar a 450 nm.

Experimentos de protección tumoral *in vivo*: para el experimento de protección tumoral, se vacunaron ratones (5 por grupo) mediante un disparo biolístico con 2 µg de ADN de CRT, ADN de E7, ADN de CRT/E7 o no se vacunaron. Una semana después, los ratones recibieron una dosis de refuerzo con la misma pauta posológica que la primera vacunación. Una semana después de la última vacunación, los ratones recibieron una provocación subcutánea con 5 x 10⁴ células TC-1/ratón en la pata derecha. Los ratones se monitorizaron para detectar indicios de crecimiento tumoral mediante palpación e inspección dos veces a la semana hasta que se sacrificaron el día 60.

Experimentos de tratamiento tumoral *in vivo*: los ratones C57BL/6 (5 por grupo) recibieron una provocación

intravenosa con 1×10^4 células tumorales TC-1 por ratón a través de la vena de la cola el día 0. Tres días después de la provocación con las células tumorales TC-1, a los ratones se les dio 2 µg de ADN de CRT, ADN de E7, o ADN de CRT/E7 mediante el disparo biolístico o no se vacunaron. Una semana después, estos ratones recibieron una dosis de refuerzo con la misma pauta posológica que la primera vacunación. Los ratones se monitorizaron dos veces a la semana y se sacrificaron el día 21. El número de nódulos metastásicos pulmonares de cada ratón lo evaluaron y lo contaron experimentadores que desconocían la identidad de la muestra.

Los ratones atímicos (BALB/c nu/nu) (5 por grupo) recibieron una provocación intravenosa con 1×10^4 células tumorales TC-1 por ratón a través de la vena de la cola el día 0. Dos días (D2) después de la provocación con las células tumorales TC-1, a los ratones se les dio 16 µg de ADN de CRT, ADN de E7, ADN de CRT/E7 o el plásmido vacío sin el inserto mediante disparo biolístico. El día 9 y el día 16, estos ratones recibieron una dosis de refuerzo con la misma pauta posológica que la primera vacunación. Los ratones se sacrificaron el día 21. Los nódulos pulmonares de cada ratón los evaluaron y contaron experimentadores que desconocían la identidad de la muestra.

Experimentos de agotamiento de anticuerpos *in vivo*: ciertos anticuerpos se agotaron *in vivo* tal y como describe Lin (1996) *Cancer Res.* 56: 21-26. Brevemente, se vacunó a los ratones con 2 µg de ADN de CRT/E7 mediante disparo biolístico, recibieron una dosis de refuerzo una semana después y se provocaron con 5×10^4 células tumorales TC-1 por ratón. Los agotamientos comenzaron una semana antes de la provocación tumoral. Se utilizó el Acm NK1.5 (Dialynas (1983) *Immunol. Rev.* 74: 29-56) para el agotamiento de CD4, se utilizó el Acm 2.43 (Sarmiento (1980) *J. Immunol.* 125: 2665) para el agotamiento de CD8 y se utilizó el Acm PK136 (Koo (1986) *J. Immunol.* 137: 3742-3747) para el agotamiento de NK1.1. El análisis por citometría de flujo reveló que desapareció > 99% del subconjunto de linfocitos adecuados, mientras se mantenía la cantidad normal de los otros grupos. El agotamiento se terminó el día 40 después de la provocación tumoral.

Generación de células dendríticas: se generaron células dendríticas (CD) mediante el cultivo de células de la médula ósea en presencia de GM-CSF tal y como describe Fernández (1999) *Nat. Med.* 5: 405-411). Brevemente, se recogió la médula ósea del fémur y de la tibia de los ratones. Se lisaron los eritrocitos y las células restantes se pasaron a través de una malla de nilón para retirar las piezas pequeñas de hueso y desecho. Se recogieron las células y se colocaron a 1×10^6 células/ml en placas de 24 pocillos en RPMI 1640, complementado con STF al 5%, 2 mM de 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales al 1%, 100 D/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Life Technologies, Rockville, MD) y 100 U/ml de GM-CSF (Pharmingen, San Diego, CA). Cada dos días se reemplazaron dos terceras partes del medio, y las células no adherentes se recogieron el día 7. Las células recogidas se caracterizaron por análisis de citometría de flujo de los marcadores de las CD como se describió anteriormente (25).

Generación de líneas de linfocitos T CD8+ específicos de E7: se generaron líneas de linfocitos CD8+ específicos de E7 mediante la inmunización de ratonas C57BL/6 hembra (H-2b) por inyección intraperitoneal del vector de expresión que expresa la vacuna de E7 (una secuencia que codifica la proteína 1 asociada a la membrana del lisosoma (LAMP-1) se fusionó con la secuencia codificante de E7 del VPH para construir un ADN quimérico, denominado Sig/E7/LAMP-1, como se explica en Ji (1999) *Hum. Gene. Ther.* 10: 2727-2740). Se recogieron esplenocitos el día 8. Para la estimulación inicial *in vitro*, los esplenocitos se sensibilizaron con IL-2 a una concentración de 20 U/ml y 1 µM del péptido de E7 (aminoácidos 49 a 57) durante 6 días. La propagación de la línea celular de LTC específicos de E7 se realizó en placas de 24 pocillos con la mezcla (2 ml/pocillo) de 1×10^6 esplenocitos que contienen LTC específicos de E7 con 3×10^6 esplenocitos irradiados y posterior sensibilización con IL-2 a una concentración de 20 U/ml y 1 µM del péptido de E7 (aminoácidos 49 a 57). Este procedimiento se repitió cada 6 días. La especificidad de la línea de LTC de E7 se caracterizó con el ensayo de LTC. Se realizó la citometría de flujo para demostrar la expresión del marcador CD8.

Ensayo de LTC con células 293 D^b K^b transfectadas a modo de células diana: se realizaron ensayos de LTC en placas de 96 pocillos de fondo redondo como se describe en Corr (1999) *J. Immunol.* 163: 4721-4727. Se determinó la citólisis mediante mediciones cuantitativas de la lactato deshidrogenasa (LDH). Se utilizaron las células 293 D^b K^b transfectadas como células diana, mientras que los linfocitos T CD8+ específicos de E7 servían de células efectoras. Se transfectaron 5×10^6 células 293 D^b K^b con 20 µg de pcDNA3 (plásmido vacío), vacunas con ADN de E7, CRT o CRT/E7 con el uso de Lipofectamine 2000TM (Life Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células 293 D^b K^b se recogieron entre 40 y 44 h después de la transfección. La cantidad de proteína E7 expresada según se determinó por ELISA fue similar a la de las células 293 D^b K^b transfectadas con E7 y CRT/E7. Los ensayos de LTC se realizaron con células efectoras y células diana (1×10^4 por pocillo) mezcladas en varias proporciones (1:1, 3:1, 9:1 y 27:1) en un volumen final de 200 µl. Después de una incubación de 5 horas a 37 °C, 50 µl del medio cultivado se recogieron para valorar la cantidad de LDH en el medio cultivo utilizando los kits de ensayo CytoToxTM (Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El porcentaje de lisis se calculó según la ecuación siguiente: $100 \times (A - B)/(C - D)$, donde A es la lectura del valor de la señal efectora experimental, B es el valor de la señal de fondo espontánea de efector, C es el valor máximo de señal de las células diana, D es el valor de la señal de fondo espontánea de la diana.

Ensayo de LTC con las CD sensibilizadas con lisados de células 293 transfectadas a modo de células diana: se realizaron ensayos de LTC con células dendríticas (CD) sensibilizadas con lisados celulares a modo de células diana mediante un protocolo similar al descrito por Uger (1998) *J. Immunol.* 160: 1598-1605. Brevemente, 5×10^6

células 293 D^b K^b se transfectaron primero con 20 µg de las vacunas con ADN del pcDNA3 (plásmido vacío), de la E7, de la CRT o de la CRT/E7 gracias al uso de Lipofectamine 2000TM (Life Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células 293 D^b K^b transfectadas se recogieron de 40 a 44 horas después de la transfección y a continuación se trataron con tres ciclos de congelación y descongelación. La concentración de proteínas se determinó con el ensayo de proteínas de BioRad (Bio-Rad, Hercules, CA) de acuerdo con el protocolo del vendedor. La cantidad de la proteína E7 se determinó por ELISA y los lisados celulares de las células 293 D^b K^b transfectadas con el ADN de E7 o CRT/E7 se normalizaron por la concentración de la proteína E7. Las CD se utilizaron como células diana y se prepararon por sensibilización de 1 millón de CD con diferentes concentraciones de lisados celulares (50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml y 0,4 µg/ml) en un volumen final de 2 ml durante 16 a 20 horas. Se utilizaron linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 como células efectoras. Los ensayos de los LTC se realizaron a una proporción fija (9/1) de E/D con 9×10^4 de linfocitos T específicos de E7 mezclados con 1×10^4 CD preparadas en un volumen final de 200 µl. Se determinó la citólisis mediante mediciones cuantitativas de la LDH según se describe anteriormente.

Estudios histológicos e inmunohistoquímicos: se generaron bloques de parafina de los nódulos pulmonares de los ratones vacunados y se cortaron en secciones de 6 µm y se desparafinaron. Se tiñeron con hematoxilina y eosina para el examen habitual al microscopio óptico y se prepararon cortes sin tefir para el estudio inmunohistoquímico. Los anticuerpos monoclonales anti-CD31 de ratón (DAKO, Carpinteria, CA) se utilizaron para la detección de microvasos intratumorales. La tinción inmunohistoquímica se realizó en los cortes de ambas muestras mediante el protocolo que se describe en Huang (1999) *Hum. Pathol.* 30: 587-591. La densidad de los microvasos (DMV) se midió como se describe en Cheng (1999) *Cancer* 85: 651-657. Brevemente, los cortes teñidos se examinaron con pocos aumentos (40x y 100x aumentos totales) para identificar las áreas con la neovascularización más alta (también denominadas puntos calientes) en cada tumor. En cada corte se eligieron las tres áreas más vascularizadas. El número de microvasos se obtuvo a 200x aumentos (objetivo de 20 x y ocular de 10 x (microscopio Olympus BH-2), 0,74 mm² por campo con el tamaño del campo medido con un micrómetro ocular) y se calculó el número medio para tres campos de cada tumor, denominado el valor de la densidad de los microvasos (DMV). Se descartaron del recuento los vasos grandes con paredes musculares gruesas y una luz más grande que ocho células sanguíneas, apropiadamente. Todas las mediciones fueron realizadas por un único anatomopatólogo que desconocía la identidad de la muestra.

Generación y caracterización de la vacuna con ADN de la fusión CRT/E7: en la figura 1 se presenta un diagrama esquemático de las construcciones de la calreticulina (CRT), E7 y calreticulina/E7 (CRT/E7). Todas las construcciones se han confirmado por secuenciación del ADN. Para demostrar que la proteína E7 se expresa en las construcciones que contienen E7, se realizó un análisis de inmunotransferencia Western con lisados de células 293 D^b K^b transfectadas con distintas construcciones de ADN que contienen E7. Las células 293 D^b K^b transfectadas con la E7 de tipo silvestre mostraron una banda de 30 kDa que corresponde a la E7 del VPH-16. Además, las células 293 D^b K^b transfectadas con la CRT/E7 mostraron una banda que corresponde a la proteína quimérica CRT/E7. No se observaron bandas visibles en los controles negativos, 293 D^b K^b transfectadas con calreticulina o con el plásmido vacío.

La vacunación con el ADN de la fusión de CRT/E7 mejora significativamente la cantidad de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7: los linfocitos T CD8⁺ (LTC) son uno de los efectores más cruciales para inducir inmunidad antitumoral. Para determinar la cantidad de precursores de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 inducidos tras la administración *in vivo* (a ratones) de la vacuna con ADN de CRT/E7 de la invención, se utilizó la tinción de citocinas intracelulares como se describe en Ji (1999) *Human Gene Therapy* 10: 2727-2740. La tinción de las citocinas intracelulares es un ensayo funcional sensible que se utiliza para medir la producción de IFN-γ (IFN-K) a nivel de una sola célula, lo que puede por tanto aplicarse para cuantificar los linfocitos T CD8⁺ específicos del antígeno. Los resultados del análisis por citometría de flujo (realizado según se explica anteriormente) se muestran en el histograma bidimensional de la figura 2A. Como se resume en la figura 2B, los ratones vacunados con el ADN de CRT/E7 indujeron el número más alto de precursores de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 que expresan el IFN-γ ($204/3,5 \times 10^5$ esplenocitos), mientras que los ratones vacunados con el ADN de E7 indujeron menos precursores ($47/3,5 \times 10^5$ esplenocitos) ($p < 0,01$). La inmunización con la construcción quimérica CRT/E7 incrementó 5 veces el número de precursores de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7. Estos resultados también indicaron que la fusión de E7 con CRT (a saber, la expresión como una proteína de fusión) era necesaria para realizar la actividad de los linfocitos T CD8⁺, ya que la vacunación con dos vectores, uno que expresa sólo CRT mezclado con uno que expresa sólo E7 («CRT + E7» en la figura 2B) no realizó la actividad de los linfocitos T CD8⁺.

La vacunación con el ADN de la fusión CRT/E7 no realiza las respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T CD4⁺ específicos de E7: para examinar la generación de linfocitos precursores T («cooperadores») CD4⁺ específicos de E7 y los perfiles de las citocinas inducidas por cada una de estas vacunas, realizamos una doble tinción para el marcador de superficie CD4 y el IFN-γ intracelular en los esplenocitos de los ratones inmunizados, y luego se analizó por citometría de flujo. Los esplenocitos de los ratones inmunizados se cultivaron *in vitro* con el péptido de E7 (aa 30 a 67) durante una noche y se tiñeron por el CD4 y por el IFN-γ intracelular. El péptido de E7 (aa 30 a 67) contiene un epítipo importante de linfocito T cooperador en la proteína del marco abierto de lectura de E7 del VPH-16 (Tindle (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5887-5891). El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que secretan IFN-γ se analizó por citometría de flujo. Los ratones vacunados con las construcciones quiméricas CRT/E7 indujeron un número similar de células positivas dobles para CD4⁺ e IFN-γ en comparación con los

ratones vacunados con el ADN de E7 de tipo silvestre ($25/3,5 \times 10^5$ esplenocitos frente a $20/ 3,5 \times 10^5$ esplenocitos, $p > 0,05$) u otros grupos de ADN. No hubo ninguna diferencia significativa en el número de linfocitos CD4+ IFN- γ + específicos de E7 que se observaron con la tinción de citometría de flujo entre los ratones sin tratar o los ratones vacunados con el plásmido vacío, CRT, E7, CRT + E7, o construcciones CRT/E7.

También se valoró el número de linfocitos T CD4+ específicos de E7 que secretan IL-4 en los ratones vacunados con distintas vacunas con ADN. Los esplenocitos activados de ratón que secretan IL-4 (MiCK-2TM, Pharmingen, San Diego, CA) se utilizaron como controles positivos para garantizar el éxito de la tinción de la IL-4 intracelular para este estudio. La especificidad de la tinción de la IL-4 se demostró mediante la ausencia de linfocitos T CD4+ IL-4+ cuando se omitió el anticuerpo contra IL-4. No se identificó una cantidad significativa de linfocitos doblemente positivos CD4+ IL-4+ en los ratones vacunados con ADN de CRT/E7, de CRT, o de E7 de tipo silvestre, vacunación con el ADN plasmídico o en los ratones intactos sin vacunación. Además, no se observó ninguna variación significativa de la frecuencia de linfocitos T CD4+ IL-4+ que secretan IL-4 entre los diferentes grupos de vacunación.

La vacunación con CRT/E7 indujo títulos más altos de anticuerpos específicos de E7: la cantidad de anticuerpos anti-E7 del VPH-16 en el suero de los ratones vacunados se determinó mediante un ELISA directo dos semanas después de la última vacunación. Como se muestra en la figura 3, el grupo vacunado con CRT/E7 indujo el título más alto de anticuerpos anti-E7 en los sueros de los ratones en comparación con otros grupos vacunados ($P < 0,01$). Este resultado demostró que los ratones vacunados con la construcción quimérica CRT/E7 de la invención indujeron respuestas por anticuerpos específicos de E7 significativamente más altas.

La vacunación con la construcción quimérica CRT/E7 realza la protección de los ratones contra el crecimiento de los tumores TC-1: para determinar si la vacunación con las diferentes construcciones de vacunas con ADN protege a los ratones frente a los tumores que expresan la E7, se realizaron experimentos de protección tumoral *in vivo*. Los ratones se vacunaron con 2 μ g de ADN desnudo/ratón mediante disparo biolístico y recibieron la misma dosis de refuerzo una semana después. A continuación, los ratones se provocaron con 5×10^4 células TC-1/ratón por vía subcutánea en la pata derecha 7 días después de la última vacunación. Tal y como se muestra en la figura 4, el 100% de los que recibían la vacunación con la construcción quimérica CRT/E7 permanecieron libres de tumor 60 días después de la provocación con TC-1. En cambio, todos los ratones sin vacunar y los ratones que recibieron ADN del plásmido vacío, de CRT, de E7 de tipo silvestre o de CRT + E7 de tipo silvestre tuvieron crecimiento tumoral en el plazo de 15 días después de la provocación con el tumor. Estos resultados también indicaron que la fusión de E7 con la calreticulina era necesaria para la inmunidad antitumoral, ya que las construcciones que expresaban sólo la calreticulina mezclada con construcciones que expresan sólo la E7 («CRT + E7» en la figura 4) no indujeron ningún refuerzo de la inmunidad antitumoral. Por lo tanto, las construcciones quiméricas CRT/E7 de la invención mejoraron significativamente la protección contra el crecimiento de los tumores de TC-1.

La vacunación con la construcción quimérica CRT/E7 erradica de los pulmones los tumores establecidos que expresan la E7: para determinar el potencial terapéutico de una construcción de ADN con la quimera CRT/E7 a la hora de tratar las metástasis tumorales de TC-1 en los pulmones, los ratones C57BL/6 se provocaron primero con 1×10^4 células tumorales TC-1 por ratón mediante inyección intravenosa en la vena de la cola (modelo de metástasis pulmonar) Ji (1998) *Int. J. Cancer* 78: 41-45. Los ratones se trataron luego con 2 μ g de ADN desnudo mediante disparo biolístico siete días después y recibieron la misma dosis de refuerzo una semana después. A continuación, los ratones se sacrificaron 30 días después de la provocación tumoral. Como se muestra en la figura 5, los ratones vacunados con la construcción quimérica CRT/E7 revelaron el número medio más bajo de nódulos pulmonares ($4,0 \pm 1,6$) en comparación con los ratones vacunados con el ADN que solo lleva la E7 de tipo silvestre ($77,6 \pm 9,8$) o el ADN que solo lleva la calreticulina ($26,4 \pm 4,9$) (ANOVA monofactorial, $p < 0,001$). Los datos se expresan como el número medio de nódulos tumorales metastásicos en el pulmón + EEM. Es interesante señalar que los ratones vacunados con el ADN de la calreticulina de tipo silvestre mostrasen un número medio de nódulos menor que los ratones que recibieron el ADN de la E7 de tipo silvestre o sin ninguna vacunación (ANOVA monofactorial, $p < 0,001$). Ya que los ratones vacunados únicamente con la CRT no indujeron respuestas inmunitarias de linfocitos T específicos de E7, los efectos terapéuticos (menor número de nódulos metastásicos en el pulmón) que se observan con la CRT sola pueden estar ocasionados por un efecto antiangiogénico mediado por la CRT.

Los linfocitos T CD8+, pero no los linfocitos T CD4+ ni los linfocitos citolíticos naturales, son esenciales para el efecto antitumoral inducido por la vacuna con ADN quimérico de CRT/E7 de la invención: para determinar el subconjunto de linfocitos que son importantes para el rechazo de las células tumorales que expresan E7, realizamos experimentos de agotamiento de anticuerpos *in vivo*. El agotamiento de los subconjuntos de linfocitos se valoró el día de la inyección tumoral, y cada semana a partir de entonces, mediante el recuento de esplenocitos por citometría de flujo. Se consiguió agotar más del 99% del subconjunto apropiado, mientras se mantenía una cantidad normal de los otros conjuntos de linfocitos. Todos los ratones sin tratar y todos los ratones sin los linfocitos T CD8+ por agotamiento desarrollaron tumores en menos de 14 días desde de la provocación tumoral. En cambio, los ratones sin agotamiento y los ratones sin linfocitos T CD4+ o sin linfocitos NK1.1, por agotamiento, permanecieron sin tumores 60 días después de la provocación tumoral. Estos resultados demuestran que los linfocitos T CD8+ son esenciales para la inmunidad antitumoral inducida por la vacuna quimérica de CRT/E7 de la invención.

Realce de la presentación de E7 a través de la vía del CMH de clase I en las células transfectadas con el ADN de CRT/E7: tal y como se explicó anteriormente, los ratones vacunados con la construcción quimérica CRT/E7 de la

invención indujeron el número más alto de precursores de linfocitos T CD8+ específicos de E7. Para determinar el mecanismo responsable de este efecto, se determinó si estaba realizada la presentación de E7 por el CMH de clase I en las células diana, en este caso las células 293 de riñón embrionario de humano que expresan D^b y K^b transfectadas con la proteína de fusión CRT/E7 que codifica el ADN quimérico. Los ensayos de LTC con linfocitos T CD8+ específicos de E7 restringidos a D^b como células efectoras se utilizaron para determinar si las células diana (células 293 D^b K^b) transfectadas con una construcción CRT/E7 se pueden destruir con más eficacia que las células 293 D^b K^b transfectadas solo con la E7 de tipo silvestre. Se utilizaron las células 293 D^b K^b como células diana porque se ha visto que tienen una eficacia de transfección estable, mientras que las células dendríticas no se transfectan *in vivo* con tanta facilidad. Además, el nivel de expresión de la E7 en las células 293 D^b K^b es similar entre las células transfectadas con diferentes construcciones de ADN que contienen la E7. Los ensayos de LTC se realizaron con las células 293 D^b K^b sin tratar y con células 293 D^b K^b transfectadas con ADN del plásmido vacío, de CRT, de E7 o de la CRT/E7 quimérica a diferentes proporciones de efectoras/diana (E/D) (1:1, 3:1, 9:1, 27:1) utilizando una línea de linfocitos T específicos de E7. Tal y como se muestra en la figura 6, las células 293 D^b K^b transfectadas con el ADN de CRT/E7 indujeron porcentajes significativamente más altos de lisis específica en las proporciones de E/D 9:1 (20,5 + 1,0% frente a 10,43 + 0,9%, $p < 0,001$) y 27:1 (47,1 + 5,5% frente a 15,1 + 3,0%, $p < 0,001$) en comparación con los ratones vacunados con la vacuna con ADN que lleva solo la E7 de tipo silvestre. Estos resultados indicaron que las células transfectadas con las construcciones quiméricas CRT/E7 de la invención eran capaces de presentar el antígeno de E7 mediante «sensibilización directa» a través de la vía del CMH de clase I de una manera más eficaz que las células transfectadas con el ADN de E7 de tipo silvestre.

Realce de la presentación de E7 a través de la vía del CMH de clase I en las células dendríticas sensibilizadas con la proteína quimérica CRT/E7: otro posible mecanismo que realiza *in vivo* la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD8+ específicos de E7 es la presentación de E7 a través de la vía del CMH de clase I mediante las células presentadoras de antígeno por medio de la captación de células lisadas que expresan diferentes construcciones de ADN, también llamada «sensibilización cruzada». Se realizó un experimento de sensibilización cruzada para caracterizar la presentación de E7 por el CMH de clase I en las células dendríticas sensibilizadas con lisados celulares de células 293 D^b K^b transfectadas con ADN del plásmido vacío, de la calreticulina, de E7 o de CRT/E7. Los linfocitos T CD8+ específicos de E7 sirvieron de células efectoras. Tal y como se mencionó anteriormente, las células 293 D^b K^b se ha demostrado que tienen una eficacia de transfección estable y una expresión de E7 similar entre las células transfectadas con diferentes construcciones de ADN que contienen la E7. Los lisados de las células 293 D^b K^b transfectadas se obtuvieron con ciclos de congelación y descongelación. Las CD procedentes de médula ósea se sensibilizaron con una dilución en serie de lisados de células 293 D^b K^b transfectadas (50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml y 0,4 µg/ml). Las CD se usaron de célula diana, mientras que los linfocitos T CD9+ específicos de E7 hicieron de células efectoras. Los ensayos de LTC se realizaron a una proporción de E/D fija (9/1). Tal y como se muestra en la figura 7, las CD sensibilizadas con lisados de células 293 D^b K^b transfectadas con ADN de CRT/E7 indujeron porcentajes significativamente más altos de lisis específica que las CD sensibilizadas con lisados de células 293 D^b K^b transfectadas con las otras construcciones de ADN y que las CD intactas ($p < 0,001$). Estos resultados revelaron que las células dendríticas sensibilizadas con la proteína de fusión CRT/E7 (presentes en los lisados celulares de las células 293 D^b K^b transfectadas) son capaces de presentar el antígeno E7 a través de la vía del CMH de clase I de una manera más eficaz que las células dendríticas sensibilizadas con los lisados de las células 293 D^b K^b transfectadas sólo con las construcciones que codifican la proteína de E7 de tipo silvestre. Estos datos demuestran que la fusión de CRT a E7, a saber, la expresión del polipéptido de E7 como una proteína de fusión con la calreticulina, refuerza la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD8+ específicos de E7 a través de efectos de sensibilización tanto cruzada como directa.

El tratamiento con vacunas con ADN de la quimera CRT/E7 o de CRT erradica los tumores establecidos en los pulmones de ratones atímicos: tal y como se explicó anteriormente, los ratones tratados con el ADN de CRT de tipo silvestre mostraron un menor número medio de nódulos pulmonares que los ratones que reciben el ADN que solo lleva la E7 de tipo silvestre o que no reciben ninguna vacunación (ANOVA monofactorial, $p < 0,001$). Ya que los ratones vacunados con CRT no indujeron respuestas inmunitarias de linfocitos T específicos de E7 (véase la figura 2), los efectos terapéuticos (disminución del número de nódulos pulmonares metastásicos) observados cuando se administran construcciones que solo expresan CRT pueden no estar relacionados con la respuesta inmunitaria antitumoral (a saber, incremento de LTC específicos de antígeno). Para evaluar la importancia de los polipéptidos de la fusión CRT/E7 en comparación con el polipéptido de E7 o de CRT solas en el tratamiento de metástasis tumorales de TC-1 en los pulmones sin ninguna célula efectora inmunitaria, los ratones atímicos (BALB/c nu/nu) (animales que carecen de los linfocitos citotóxicos (LTC) y cooperadores T y que son incapaces de inducir una respuesta inmunitaria celular o humoral) se provocaron primero con 1×10^4 células tumorales TC-1 por ratón a través de una inyección intravenosa en la vena de la cola, según se explicó anteriormente. Dos días después de la provocación con las células tumorales TC-1, a los ratones se les dieron 16 µg de ADN que codifica CRT/E7, E7 o CRT, o el plásmido vacío sin inserto, mediante disparo biolístico. Los días 9 y 16, estos ratones recibieron un refuerzo con la misma dosis que la primera vacunación. Los ratones se sacrificaron el día 21. Se evaluaron y contaron los nódulos pulmonares de cada ratón. Tal y como se muestra en la figura 8, los ratones atímicos tratados con las construcciones que expresan solo la CRT o la proteína de fusión CRT/E7 revelaron un menor número medio de nódulos pulmonares (6,0 + 2,8 para CRT, 2,5 + 0,7 para CRT/37) que los ratones vacunados con el ADN que lleva solo la E7 de tipo silvestre (36,0 + 2,8), que lleva solo el vector (35,5 + 12,0) o que el grupo sin tratamiento (47,5 + 2,1) (ANOVA monofactorial, $p < 0,001$). Estos datos indicaron que los efectos antitumorales inducidos por las

vacunas con ADN de CRT o de CRT/E7 eran independientes de las respuestas inmunitarias antitumorales.

El tratamiento con vacunas con ADN de la quimera CRT/E7 o de CRT redujeron significativamente la densidad de los microvasos de los tumores en los pulmones de los ratones atímicos: para determinar si este efecto antitumoral del ADN de CRT/E7 o de CRT en ausencia de los efectores inmunitarios es a través de una vía antiangiogénica, se midió la densidad de los microvasos (DMV) en los tumores pulmonares de los ratones atímicos tratados con diferentes vacunas con ADN. Las células endoteliales se tiñeron con el anticuerpo anti-CD31 según se describe anteriormente. Todas las mediciones fueron realizadas por un único anatomopatólogo que no conocía ningún dato de tratamiento antes del recuento. Los ratones atímicos (que carecen de un sistema inmunitario funcional) vacunados con las vacunas con ADN de CRT/E7 o de CRT revelaron mucha menos DMV en los tumores pulmonares que los ratones atímicos tratados con la E7 de tipo silvestre o con el grupo del vector de control (ANOVA monofactorial, $p < 0,001$). Estos datos indicaban que los ratones tratados con las vacunas que expresan la proteína de fusión CRT/E7 o que expresan CRT presentarían efectos antiangiogénicos en los tumores.

Ejemplo comparativo 2

Los virus de ARN autorreplicante realzan la respuesta de los LTC específicos de antígeno

En una realización, la invención da a conocer un replicón de ARN autorreplicante que expresa una proteína quimérica de la invención: una proteína que comprende un primer dominio polipeptídico que comprende un polipéptido de chaperona del retículo endoplasmático (RE) y un segundo dominio polipeptídico que comprende al menos un péptido antigénico. El ejemplo que sigue describe los estudios que demuestran que, mediante los procedimientos de la invención, estas construcciones son eficaces para mejorar las respuestas *in vivo* de los linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos de antígeno. Como sistema modelo, una proteína de fusión que comprende la E7 del VPH-16 y la HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* se expresó *in vivo* en un vector de ARN autorreplicante del virus de Sindbis, SINrep5. Se determinó la potencia de la inmunidad específica del antígeno inducida por este vector. Estos resultados también demuestran que las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de chaperona del RE y un péptido antigénico expresado *in vivo* en un vector de ARN autorreplicante del virus de Sindbis son eficaces para potenciar la respuesta *in vivo* de LTC específicos del antígeno.

Estos experimentos demostraron que una vacuna con el replicón de ARN que contiene la fusión génica E7/HSP70 indujo una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T específicos de E7 significativamente más alta que las vacunas que contenían el gen de E7 de tipo silvestre en los ratones vacunados. Además, los estudios *in vitro* demostraron que el antígeno E7 de las células apoptóticas transfectadas con el replicón de ARN con la E7/HSP70 puede ser captado por las células dendríticas procedentes de la médula ósea y presentarse con más eficacia a través de la vía del CMH de clase I que las células apoptóticas transfectadas con el replicón de ARN con la E7 de tipo silvestre. Más importante aún, la fusión de HSP70 con la E7 convirtió una vacuna poco eficaz en una con una potencia significativa contra los tumores que expresan la E7. Este efecto antitumoral dependía de los linfocitos citolíticos naturales y de los linfocitos T CD8+. Estos resultados indicaron que la fusión de HSP70 a un gen de antígeno realzó enormemente la potencia de las vacunas con ARN autorreplicante. Estos resultados demostraron que una vacuna con el ARN de Sindbis en la que se conecta la E7 a la HSP70 incrementó considerablemente la expansión y activación de los linfocitos T CD8+ específicos de E7 y de los linfocitos citolíticos naturales, saltándose completamente la vía del CD4 y dando lugar a una inmunidad antitumoral potente contra los tumores que expresan la E7.

Se investigó adicionalmente el mecanismo de la vacuna con el ARN del Sindbis que favorecía el efecto antitumoral. Se encontró que la vacuna con el ARN del Sindbis con la E7/HSP70 podía inducir la muerte apoptótica de las células hospedadoras y favorecer que las células dendríticas fagociten estas células, lo que incrementó considerablemente la expansión y la activación de los linfocitos T CD8+ específicos de E7. El realce de esta respuesta de CD8 dio lugar a una inmunidad antitumoral potente contra una línea de células tumorales que expresan la E7.

La E7 del VPH-16 se eligió como antígeno modelo para el desarrollo de vacunas porque los VPH, en particular el VPH-16, están asociados a la mayoría de los cánceres de cuello uterino, como se explicó anteriormente.

Construcciones de ADN plasmídico y su preparación: los vectores pcDNA3-HSP70, pcDNA3-E7 y pcDNA3-E7/HSP70 se construyeron como se describe en Chen (2000), véase más arriba. El vector del replicón de ARN del virus de Sindbis, SINrep5, ha sido descrito por Bredenbeek, véase más arriba. Los vectores SINrep5-HSP70, SINrep5-E7 y SINrep5/E7/HSP70 se construyeron mediante el aislamiento de los fragmentos de ADN que codifican la HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis*, la E7 del VPH-16 y la quimera E7/HSP70 cortando el pcDNA3-HSP70, el pcDNA3-E7 y el pcDNA3-E7/HSP70, respectivamente, con las enzimas de restricción XbaI y PmeI. Los productos digeridos se aislaron en gel. Estos fragmentos de ADN aislados se clonaron luego en los correspondientes sitios de XbaI y PmeI del vector SINrep5 para formar las construcciones SINrep5-HSP70, SINrep5-E7 y SINrep5-E7/HSP70. La exactitud de estas construcciones se confirmó mediante secuenciación del ADN.

Preparación del ARN *in vitro*: la generación de los transcritos de ARN de SINrep5-HSP70, SINrep5-E7, SINrep5-E7/HSP70 y SINrep5 se realizó con el protocolo descrito por Mandl (1998) *Nature Med.* 4: 1438-1440. Se utilizó Spel

para linealizar los moldes de ADN para la síntesis de los replicones de ARN desde SINrep5-HSP70, SINrep5-E7, SINrep5-E7/HSP70 y SINrep5. Las vacunas con ARN se transcribieron *in vitro* y se les añadió la caperuza con la ARN polimerasa de SP6 y análogo de la caperuza a partir de un kit de transcripción *in vitro* estándar (Life Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con el manual del vendedor. Tras la síntesis se retiró el ADN mediante digestión con ADNasa I. El ARN sintetizado se cuantificó y se analizó en geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído (Mandl (1998) véase más arriba). El ARN purificado se dividió en alícuotas que se utilizarán para la vacunación de animales y para la transfección de una línea celular BHK21. La expresión de la proteína de los transcritos se valoró mediante la transfección del ARN en las células BHK21 por electroporación.

Líneas celulares: se obtuvieron células de riñón de hámster lactante (BHK21) de la ATCC (Rockville, MD) y se hicieron crecer en Glasgow MEM complementado con STF al 5%, caldo de fosfato de triptosa al 10%, glutamina a 2 mM y antibióticos. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ con un 5% de humedad y se pasaron cada 2 días. La producción y el mantenimiento de las células TC-1 se hizo como se describe en Lin (1996) *Cancer Res.* 56: 21-26. El día de la provocación con el tumor se recogieron las células TC-1 mediante tripsinización, se lavaron dos veces con una solución salina tamponada de Hanks (HBSS, por su nombre en inglés) a 1X y, finalmente, se resuspendieron en HBSS a 1 X a la concentración deseada para la inyección.

ELISA para la expresión de la proteína E7 de las vacunas con ARN en SINrep5: la expresión de la proteína E7 desde el ARN de SINrep5-E7 y de SINrep5-E7/HSP70 se determinó mediante un procedimiento de ELISA indirecto. La cantidad de la proteína E7 se determinó con lisados celulares de células BHK21 transfectadas con SINrep5-E7 o con SINrep5-E7/HSP70. Brevemente, diez millones de células BHK21 se transfectaron con 4 µg de los transcritos de ARN de SINrep5, SINrep5-E7, SINrep5-HSP70 o SINrep5-E7/HSP70, respectivamente, por electroporación como se describe en Liljestrom (1991) *J. Virol.* 65: 4107-4113. Las células BHK21 transfectadas se recogieron de 16 a 20 horas tras la electroporación. Una placa de 96 micropocillos se revistió con lisados celulares de BHK21 que se transfectaron con diferentes ARN de SINrep5 en un volumen final de 100 µl y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las proteínas E7 del VPH-16 procedentes de bacterias se utilizaron como control positivo. A continuación, los pocillos se bloquearon con PBS que contiene suero bovino fetal al 20%. Se añadió anticuerpo diluido anti-E7 (Zymed, San Francisco, CA) a los pocillos de ELISA, y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de lavar con PBS que contiene Tween-20 al 0,05%, la placa se incubó con la dilución 1/2000 de un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA) a la temperatura ambiente (TA) durante una hora. Se lavó la placa, se reveló con 1-Step™ Turbo TMB-ELISA (Pierce, Rockford, IL) y se paró con 1 M de H₂SO₄. La placa de ELISA se leyó con un lector de ELISA estándar a 450 nm. A continuación se calculó la cantidad de proteína E7 de los lisados celulares y se determinó por comparación con la proteína E7 estandarizada.

Ratones: se compraron las ratonas C57BL/6 hembra de 6 a 8 semanas de edad al National Cancer Institute (Frederick, MD) y se mantuvieron en el animalario de oncología del Johns Hopkins Hospital (Baltimore, MD). Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo con los protocolos autorizados y de acuerdo con las recomendaciones para el uso y cuidado apropiados de los animales de laboratorio.

Vacunación con el ARN: todas las vacunas con el ARN de SINrep5 se generaron mediante la transcripción *in vitro* que se describió anteriormente. La concentración del ARN se determinó mediante densidad óptica medida a 260 nm. La integridad y cantidad de los transcritos de ARN se comprobó además por electroforesis en gel desnaturalizante. Los ratones se vacunaron por vía intramuscular con 10 µg de diferentes ARN de SINrep5 en la pata trasera derecha, excepto para SINrep5-E7/HSP70, de la que se administraron las cantidades de 0,1, 1 y 10 µg.

ELISA para los anticuerpos contra la E7: los anticuerpos anti-E7 del VPH-16 del suero se determinaron mediante un ELISA directo tal y como describe Wu (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11671-11665. Se revistió una placa de 96 micropocillos con 100 µl de proteínas E7 del VPH-16 procedentes de bacterias a 5 µg/ml y se incubó a 4 °C durante una noche. A continuación, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía suero bovino fetal al 20%. Se prepararon sueros de ratones a los 14 días de la inmunización, diluidos en serie en PBS, se añadieron a los pocillos de ELISA, y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Tras lavar con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%, la placa se incubó con una dilución 1/2000 de un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA) a TA durante una hora. La placa se lavó, se reveló con 1-STEP™ Turbo TMB-ELISA (Pierce, Rockford, IL) y se paró con 1 M de H₂SO₄. La placa de ELISA se leyó con un lector de ELISA estándar a 450 nm.

Inmunoensayo enzimático (ELISA) para el IFN-γ. Se recogieron esplenocitos 2 semanas después de la vacunación y se cultivaron con el péptido de E7 (aa 49 a 57) que contenía el epítipo para el CMH de clase I (Feltkamp (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 2242-2249) o el péptido de E7 (aa 30 a 67) que contiene el péptido para el CMH de clase II (Tindle, véase más arriba) en un volumen total de 2 ml de RPMI 1640, complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), 50 unidades/ml de penicilina y estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, y 2 mM de aminoácidos no esenciales, en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos durante 6 días. Los sobrenadantes se recogieron y se les analizó la presencia del IFN-γ con los kits de ELISA (Endogen, Woburn, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ensayos de linfocitos T citotóxicos (LTC): se realizaron los ensayos de LTC en placas con fondo redondeado de 96 pocillos como describió Corr (1999) *J. Immunol.* 163: 4721-4727. Se determinó la citólisis mediante mediciones cuantitativas de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Corr (1999) véase más arriba). Se recogieron los esplenocitos 2

semanas después de la vacunación con el ARN y se cultivaron con el péptido de E7 (aa 49 a 57) en un volumen total de 2 ml de RPMI 1640, complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, y 2 mM de aminoácidos no esenciales, en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos durante 6 días como células efectoras. Las células tumorales TC-1 se utilizaron como células diana. Las células TC-1 se mezclaron con los esplenocitos a diferentes proporciones de efectoras/diana (E/D). Después de una incubación de 5 horas a 37 °C, se recogieron 50 µl del medio cultivado para valorar la cantidad de LDH en el medio de cultivo de acuerdo con el protocolo del fabricante de los kits de ensayo CytoTox™ (Promega, Madison, WI). El porcentaje de lisis se calculó a partir de la siguiente ecuación: $100 \times (A - B)/(C - D)$, en donde A es la lectura del valor de la señal experimental del efector del, B es el valor de la señal espontánea de fondo del efector, C es el valor de la señal máxima de las células diana, y D es el valor de la señal espontánea de fondo de la diana.

Tinción de las citocinas intracitoplasmáticas y análisis por citometría de flujo: los esplenocitos de grupos de ratones vacunados o sin tratar se incubaron con el péptido de E7 (aa 30 a 67) que contiene el péptido para el CMH de clase II (Tindle (1999) véase más arriba) para detectar los precursores de los linfocitos T cooperadores CD4+ específicos de E7. El péptido de E7 se añadió a una concentración de 10 µg/ml durante 20 horas. Se añadió Golgistop™ (Pharmingen, San Diego, CA) 6 horas antes de recoger las células del cultivo. A continuación, las células se lavaron una vez en tampón FACScan™ y se tiñeron con anticuerpo monoclonal de rata contra CD4 de ratón conjugado con ficoeritrina (PE, por su nombre en inglés) (Pharmingen, San Diego, CA). Las células se sometieron a tinción de citocinas intracelulares con el kit Cytofix/Cytoperm™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pharmingen). El anticuerpo anti-IFN-γ conjugado con FITC y el anticuerpo de control de isotipo de inmunoglobulina (IgG1 de rata) se compraron a Pharmingen. Se efectuó el análisis en un FACScan™ de Becton Dickinson con el programa informático CELLQuest™ (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA).

Experimentos de protección tumoral *in vivo*: para el experimento de protección tumoral, se inmunizaron ratones (5 por grupo) por vía intramuscular (i.m.) con diferentes dosis de las vacunas con ARN de SINrep5-HSP70, SINrep5-E7, SINrep5-E7/HSP70 y SINrep5 vacío. Transcurridos 14 días desde la inmunización, los ratones recibieron una inyección intravenosa (i.v.) con 1×10^4 células tumorales TC-1 por ratón en la vena de la cola. Tres semanas después se sacrificaron los ratones. El peso de los pulmones y el número de nódulos pulmonares en cada ratón fue evaluado y contado con anonimato por los experimentadores.

Experimentos de agotamiento de anticuerpos *in vivo*: el procedimiento para el agotamiento de anticuerpos *in vivo* se describió previamente en, p. ej., Lin (1996), véase más arriba; Wu (1995) *J. Exp. Med.* 182: 1415-1421. De forma breve, los ratones se vacunaron por vía intramuscular con 1 µg del ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 y se provocaron con 1×10^4 células tumorales TC-1 por ratón a través de una inyección en la vena de la cola. Los agotamientos comenzaron una semana antes de la provocación tumoral. El Acm GK 1.5 (Dialynas (1983) *J. Immunol.* 131: 2445) se utilizó para el agotamiento de CD4, el Acm 2.43 (Sarmiento (1980) *J. Immunol.* 125: 2665) se utilizó para el agotamiento de CD8 y el Acm PK136 (Koo (1986) *J. Immunol.* 137: 3742) se utilizó para el agotamiento de NK 1.1. En análisis por citometría de flujo reveló que el subconjunto de linfocitos adecuados se redujo > 95% mientras se mantenía una cantidad normal en los otros conjuntos. El agotamiento se terminó 21 días después de la provocación tumoral.

Tinción de marcadores de la superficie celular y análisis por citometría del flujo: los esplenocitos retirados de los grupos de ratones sin tratar o vacunados se trataron inmediatamente con la tinción para el marcador de la superficie celular según se describe en Ji (1999) *Human Gene Therapy* 10: 2727-2740. Luego se lavaron las células una vez en tampón FACSCAN™ y se tiñeron con el anticuerpo monoclonal de rata anti-NK.1.1 de ratón conjugado a PE y el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3 de ratón conjugado a FITC (Pharmingen, San Diego, CA). La población de linfocitos citolíticos naturales se tiñó con el anticuerpo anti-NK.1.1 y no se tiñó con el anticuerpo anti-CD3. Los porcentajes de linfocitos citolíticos naturales en los ratones inmunizados con diferentes vacunas con ARN autorreplicante se analizó por citometría de flujo.

Generación y cultivo de células dendríticas (CD) desde la médula ósea: se generaron CD mediante el cultivo de células de la médula ósea en presencia de GM-CSF como se describe en Lu (2000) *J. Exp. Med.* 191: 541-550. Brevemente, se recogió la médula ósea de la tibia de los ratones. Se lisaron los eritrocitos, y las células restantes se pasaron a través de una malla de nilón para retirar los trozos pequeños de hueso y de desecho. Se recogieron las células y 1×10^6 células/ml se colocaron en placas de 24 pocillos en RPMI 1640, complementado con STF al 5%, 2 mM de β-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales al 1%, 100 U/ml de penicilina y 100 µ/ml de estreptomicina (Life Technologies, Rockville, MD) y 100 U/ml de GM-CSF (Pharmingen, San Diego, CA). Se reemplazaron dos tercios del medio cada 2 días, y las células no adherentes se recogieron al 7.º día. Las células recogidas se caracterizaron mediante análisis por citometría de flujo (FACS) para los marcadores de las CD.

Generación de líneas de linfocitos T CD8+ específicos de E7: la generación de líneas de linfocitos CD8+ específicos de E7 se hizo mediante la inmunización de ratonas C57BL/6 (H-2b) hembra mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de vacunas Sig/E7/LAMP-1. Se recogieron los esplenocitos al 8.º día. Para la estimulación *in vitro* inicial, los esplenocitos se sensibilizaron con IL-2 a una concentración de 20 U/ml y 1 µM del péptido de E7 (aminoácidos 49 a 57) durante 6 días. La propagación de la línea de LTC específicos de E7 se realizó en placas de 24 pocillos con la mezcla (2 ml/pocillo) de 1×10^6 esplenocitos que contienen LTC específicos de E7 con 3×10^6 esplenocitos

irradiados y la sensibilización con IL-2 a una concentración de 20 U/ml y 1 μ M del péptido de E7 (aminoácidos 49 a 57). Este procedimiento se repitió cada 6 días. La especificidad de la línea de LTC de E7 se caracterizó mediante un ensayo de LTC. Se realizó la citometría de flujo para demostrar la expresión del marcador CD8.

- 5 Análisis de la muerte celular *in vitro*: diez millones de células BHK21 se transfectaron con 4 μ g de los transcritos de ARN de SINrep5, SINrep5-E7, SINrep5-HSP70 o SINrep5-E7/HSP70 como se mencionó antes. Las células BHK21 sin tratar o las células BHK21 que se electroporaron sin el ARN de SINrep5 se utilizaron como control. Se recogieron las células BHK21 y se evaluaron cada 24 horas, hasta las 72 horas. Los porcentajes de células BHK21 necróticas y apoptóticas se analizaron con los kits de detección de la apoptosis con anexina V (Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido mediante análisis por citometría de flujo.
- 10 Ensayo de LTC mediante el uso de CD sensibilizadas con células apoptóticas a modo de células diana: los ensayos de LTC mediante el uso de CD sensibilizadas con células apoptóticas a modo de células diana se realizaron mediante un protocolo similar al descrito por Albert (1998) *Nature* 392: 86-89; Albert (1998) *J. Exp. Med.* 188: 1359-1368; con modificación. Brevemente, se transfectaron por electroporación 10 millones de células BHK21 con 4 μ g de diferentes ARN de SINrep5 autorreplicantes. Las células BHK21 se recogieron de 16 a 20 horas después de la electroporación. Los niveles de expresión de la proteína E7 en las células BHK21 transfectadas con los transcritos de ARN de SINrep5-E7 o de SINrep5-E7/HSP70 fueron similares, según se determinó por ELISA. A continuación, 3 x 10⁵ células BHK21 transfectadas se incubaron con 1 x 10⁵ CD procedentes de la médula ósea a 37 °C durante 48 horas. Después, estas CD preparadas se utilizaron como células diana y los linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 restringido por D^b se utilizaron de células efectoras. Se realizaron los ensayos de LTC con las células efectoras y con las células diana (1 x 10⁴ por pocillo) mezcladas a diferentes proporciones (1:1, 3:1, 9:1 y 27:1) en un volumen final de 200 μ l. Tras una incubación de 5 horas a 37 °C, se recogieron 50 μ l del medio de cultivo para valorar la cantidad de LDH en el medio cultivado según se describe más arriba. Como controles negativos se incluyeron las CD incubadas con las células BHK21 sin transfectar, las células BHK21 transfectadas solas, las CD sin tratar y la línea de linfocitos T CD8⁺ sola.
- 20 Construcción y caracterización de construcciones de ARN autorreplicante: la generación de construcciones de ADN plasmídico y la posterior preparación de las construcciones de ARN de SINrep5 autorreplicante se realizó según se describe anteriormente. El vector SINrep5 contiene los genes que codifican la ARN replicasa del virus de Sindbis y el promotor de SP6 (Bredenbeek (1993) véase más arriba). El diagrama esquemático de las construcciones de ADN de SINrep5, SINrep5-HSP70, SINrep5-E7 y SINrep5-E7/HSP70 se muestra en la figura 9A. Además, el diagrama esquemático del transcrito del ARN procedente de estas construcciones de ADN utilizando la ARN polimerasa de SP6 se muestra en la figura 9B. Una «caperuza» M⁷G metilada se localiza en el extremo 5' del ARNm, seguida de una secuencia responsable de la autorreplicación (replicasa), el gen de interés (a saber, un epítipo del péptido del CMH de clase I, una E7, una HSP70, una E7/HSP70 o similares), y una cola poliadenilada (AAAA). Se realizó un ELISA para demostrar que las células BHK21 transfectadas con diferentes construcciones de ARN autorreplicante expresaban la proteína E7. El SINrep5-E7 y el SINrep5-E7/HSP70 expresaban cantidades similares de la proteína E7.
- 35 E7.

- La vacunación con el ARN de SINrep5-E7/HSP70 autorreplicante realza una respuesta inmunitaria citotóxica específica de E7: los linfocitos T CD8⁺ son uno de los efectores más importantes para inducir la inmunidad antitumoral. Para determinar la cantidad de respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 inducida por la vacuna con el ARN de SINrep5-E7/HSP70, se utilizaron los ensayos de LTC. Los ratones se inmunizaron con diferentes vacunas con ARN autorreplicante de SINrep5 por inyección intramuscular. Se recogieron esplenocitos y muestras séricas después de 14 días. Para realizar el ensayo de citotoxicidad, los esplenocitos de las diferentes vacunas con ARN autorreplicante de SINrep5 se cultivaron con el péptido de E7 (aa 49 a 57) que contiene el epítipo para el CMH de clase I durante 6 días a modo de células efectoras. Las células tumorales TC-1 fueron las células diana. Las células TC-1 se mezclaron con los esplenocitos a diferentes E/D (proporción efectora/diana). La citólisis se determinó mediante mediciones cuantitativas de LDH. Los ensayos de LTC mostrados aquí son de un experimento representativo de los dos realizados.
- 40 La vacunación con el ARN autorreplicante de E7/HSP70 indujo un porcentaje significativamente más alto de lisis específica que las otras vacunas con ARN (*: P < 0,001, ANOVA monofactorial). El SINrep5-E7/HSP70 autorreplicante indujo un porcentaje significativamente más alto de lisis específica en comparación con los ratones vacunados con las otras vacunas con ARN de SINrep5 (P < 0,001, ANOVA monofactorial). La capacidad que tiene el ARN de SINrep5-E7/HSP70 para inducir la lisis específica se encontró que era aproximadamente 4 veces la del ARN autorreplicante de SINrep5-E7 (32,7% frente a 8,8%, proporción E/D de 45/1, p < 0,001).
- 45 La vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 hace que los linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 secreten una gran cantidad de IFN- γ . Para determinar la intensidad de la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 inducida por el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 se utilizó un ELISA que detecta la concentración del IFN- γ en el sobrenadante de los esplenocitos cultivados. Los ratones se inmunizaron con diferentes vacunas con ARN autorreplicante a través de una inyección intramuscular. Se recogieron esplenocitos y muestras séricas después de 14 días. Los esplenocitos de las diferentes vacunas con ARN autorreplicante se cultivaron *in vitro* con el péptido de E7 (aa 49 a 57) que contiene el epítipo para el CMH de clase I (o sin ningún péptido) durante 6 días. Como control negativo, se realizó también un ELISA sin el péptido. Los sobrenadantes en el

- 50 La vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 hace que los linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 secreten una gran cantidad de IFN- γ . Para determinar la intensidad de la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 inducida por el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 se utilizó un ELISA que detecta la concentración del IFN- γ en el sobrenadante de los esplenocitos cultivados. Los ratones se inmunizaron con diferentes vacunas con ARN autorreplicante a través de una inyección intramuscular. Se recogieron esplenocitos y muestras séricas después de 14 días. Los esplenocitos de las diferentes vacunas con ARN autorreplicante se cultivaron *in vitro* con el péptido de E7 (aa 49 a 57) que contiene el epítipo para el CMH de clase I (o sin ningún péptido) durante 6 días. Como control negativo, se realizó también un ELISA sin el péptido. Los sobrenadantes en el
- 55 La vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 hace que los linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 secreten una gran cantidad de IFN- γ . Para determinar la intensidad de la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 inducida por el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 se utilizó un ELISA que detecta la concentración del IFN- γ en el sobrenadante de los esplenocitos cultivados. Los ratones se inmunizaron con diferentes vacunas con ARN autorreplicante a través de una inyección intramuscular. Se recogieron esplenocitos y muestras séricas después de 14 días. Los esplenocitos de las diferentes vacunas con ARN autorreplicante se cultivaron *in vitro* con el péptido de E7 (aa 49 a 57) que contiene el epítipo para el CMH de clase I (o sin ningún péptido) durante 6 días. Como control negativo, se realizó también un ELISA sin el péptido. Los sobrenadantes en el
- 60 La vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 hace que los linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 secreten una gran cantidad de IFN- γ . Para determinar la intensidad de la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8⁺ específicos de E7 inducida por el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 se utilizó un ELISA que detecta la concentración del IFN- γ en el sobrenadante de los esplenocitos cultivados. Los ratones se inmunizaron con diferentes vacunas con ARN autorreplicante a través de una inyección intramuscular. Se recogieron esplenocitos y muestras séricas después de 14 días. Los esplenocitos de las diferentes vacunas con ARN autorreplicante se cultivaron *in vitro* con el péptido de E7 (aa 49 a 57) que contiene el epítipo para el CMH de clase I (o sin ningún péptido) durante 6 días. Como control negativo, se realizó también un ELISA sin el péptido. Los sobrenadantes en el

medio de cultivo se recogieron para detectar la concentración del IFN- γ mediante un ELISA.

Los esplenocitos del grupo con el ARN autorreplicante de E7/HSP70 estimulado con el péptido de E7 (aa 49 a 57) secretaron la concentración más alta de IFN- γ en comparación con otras vacunas con ARN ($P < 0,001$, ANOVA monofactorial). Estos resultados también indicaban que la fusión de HSP70 a E7 realizaba significativamente la actividad secretora de IFN- γ que tienen los linfocitos T CD8+ específicos de E7. Así pues, los linfocitos T CD8+ podrían estar inducidos por el epítipo de E7 para el CMH de clase I. Nota: los esplenocitos del grupo con el ARN autorreplicante de E7/HSP70 estimulados con el péptido de E7 (aa 49 a 57) secretaron la concentración más alta de IFN- γ en comparación con otras vacunas con ARN (*: $P < 0,001$, ANOVA monofactorial).

La vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 no induce respuestas inmunitarias significativas mediadas por los linfocitos T CD4+ específicos de E7: para examinar la generación de precursores de linfocitos T CD4+ específicos de E7 y los perfiles de citocinas para cada una de estas vacunas con ARN, realizamos la tinción doble para el marcador CD4 de superficie y el IFN- γ intracelular en los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados, seguido del análisis por citometría. Los esplenocitos se cultivaron *in vitro* con el péptido de E7 (aa 30 a 67) durante una noche y se tiñeron para el CD4 y para el IFN- γ intracelular. El péptido de E7 (aa 30 a 67) contiene un epítipo para cooperadores T importante en la proteína del marco abierto de lectura de E7 del VPH-16 (Tindle (1991) véase más arriba). El porcentaje de linfocitos T CD4+ que secretan el IFN- γ se analizó mediante citometría de flujo.

Los ratones vacunados con el ARN de SINrep5-E7/HSP70 indujeron un número similar de linfocitos positivos dobles CD4+ IFN- γ + en comparación con los ratones vacunados con el ARN de SINrep5-E7 ($15/3 \times 10^5$ esplenocitos frente a $12/3 \times 10^5$ esplenocitos, $p > 0,05$) u otros grupos de ARN. No había ninguna diferencia significativa en el número de células CD4+ IFN- γ + específicas de E7 observadas con la tinción para citometría de flujo entre los ratones sin tratar o los ratones vacunados con el plásmido vacío, o con ARN de E7, de HSP70 o de E7/HSP70. Los esplenocitos de ratones vacunados con el ADN de Sig/E7/LAMP-1 (Ji (1999) véase más arriba) se utilizaron como control positivo para la tinción del IFN- γ intracelular en este estudio.

La cantidad de anticuerpos contra la E7 del VPH-16 en el suero de los ratones vacunados se determinó con un inmunoensayo enzimático (ELISA) 2 semanas después de la vacunación con diferentes diluciones (1:100, 1:500, 1:1000). En el suero de los ratones vacunados, el SINrep5-E7/HSP70 no indujo títulos de anticuerpos específicos de E7 más altos que los inducidos por otras construcciones de vacunas con ARN.

La vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 protege a los ratones frente al crecimiento de tumores de TC-1: para determinar si la vacunación con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 protegió a los ratones frente a los tumores que expresan la E7, se realizó un experimento de protección tumoral *in vivo* con diferentes dosis del ARN de SINrep5-E7/HSP70 administradas por vía intramuscular en la pata trasera derecha. Los ratones se vacunaron de forma parecida con 10 μ g del ARN autorreplicante de SINrep5, de SINrep5-HSP70 y de SINrep5-E7. También se inyectaron en los ratones diferentes dosis de ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 que incluyen 0,1 μ g, 1 μ g y 10 μ g. Una semana después de la vacunación, los ratones se provocaron con células tumorales TC-1 mediante una inyección intravenosa en la vena de la cola a una dosis de 2×10^4 células/ratón. Los ratones se monitorizaron dos veces a la semana y se sacrificaron 21 días después de la provocación tumoral. Los nódulos pulmonares se evaluaron 21 días después de la provocación tumoral. Se diseccionaron los pulmones de los ratones 35 días después de la vacunación con el ARN de SINrep5 vacío (10 μ g), de SINrep5-HSP70 (10 μ g), de SINrep5-E7 (10 μ g) y de SINrep5-E7/HSP70 (0,1 μ g, 1 μ g o 10 μ g). El número medio de focos en los pulmones se utilizó como una medición de la eficacia de las diferentes vacunas con ARN autorreplicante a la hora de controlar el crecimiento del tumor que expresa la E7 del VPH-16.

El número medio de nódulos pulmonares de los ratones vacunados con las vacunas con ARN autorreplicante de E7/HSP70 (0,1 μ g, 1 μ g y 10 μ g) fue mucho menor que en los ratones vacunados con las otras vacunas con ARN ($P < 0,001$, ANOVA monofactorial). Estos resultados demostraron que las vacunas con el ARN autorreplicante de SINrep5-E7/HSP70 protegen a los ratones frente a la provocación tumoral intravenosa incluso a una dosis baja de 0,1 μ g, mientras que los ratones vacunados con 10 μ g del ARN de SINrep5 sin el inserto, 10 μ g de SINrep5-E7 o 10 μ g de SINrep5-HSP70 desarrollaron numerosos nódulos pulmonares tras la provocación con el tumor TC-1.

Los linfocitos T CD8+ y los linfocitos citolíticos naturales son importantes para el efecto antitumoral inducido por la vacunación con las vacunas con el ARN de SINrep5-E7/HSP70: para determinar los tipos de linfocitos que son importantes para la protección contra las células tumorales que expresan la E7, se realizaron experimentos de agotamiento de anticuerpos *in vivo* (de linfocitos T CD8+ y de linfocitos citolíticos naturales) (el porcentaje de linfocitos citolíticos naturales de los esplenocitos de ratones inmunizados con las vacunas con ARN autorreplicante fue más alto que el de sin inmunización, y no había una diferencia significativa entre el porcentaje de linfocitos citolíticos naturales entre las diferentes vacunas con ADN autorreplicante). El agotamiento de anticuerpos comenzó una semana antes de la provocación tumoral y terminó 21 días después de la provocación tumoral.

El número medio de nódulos pulmonares de los ratones en los que se han agotado los linfocitos T CD8+ y los linfocitos NK1.1 eran significativamente mayores que los del grupo sin agotamiento. Además, el agotamiento de los linfocitos NK1.1 dio lugar en los pulmones a un número medio más alto de nódulos tumorales que los ratones con

agotamiento de CD8+.

En comparación, el número medio de nódulos pulmonares en los ratones con agotamiento de linfocitos T CD4+ se parece al obtenido en los ratones sin agotamiento, lo que indica que los linfocitos T CD4+ no eran importantes para generar este efecto. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ son esenciales para la inmunidad antitumoral específica de antígeno inducida por la vacuna con el ARN de SINrep5-E7/HSP70 y que los linfocitos citolíticos naturales, aunque no se limitan a la vacuna con el ARN de E7/HSP70, también desempeñan una función importante.

También se investigó si el efecto de los linfocitos citolíticos naturales se limitaba a las vacunas con E7/HSP70 o si era el resultado del vector utilizado. El análisis por citometría de flujo de los linfocitos CD3(-), NK1.1(+) revelaron que su presencia se incrementaba notablemente en todas las construcciones (E7/HSP70, E7, HSP70 y plásmido de control) respecto a los ratones sin tratar, lo que indica que los linfocitos citolíticos naturales eran efectores importantes del efecto antitumoral que no se limita a las vacunas con E7/HSP70.

Las vacunas con ARN autorreplicante inducen la apoptosis: el ARN transcrito *in vitro* de diferentes vacunas con ARN del plásmido SINrep5 se transfectaron en las células BHK21 por electroporación. Las células BHK21 electroporadas sin ARN y las células BHK21 sin tratar se utilizaron como control. El porcentaje de células BHK21 apoptóticas y necróticas que se tiñeron mediante V-FITC-anexina y yoduro de propidio (PI, por su nombre en inglés) se analizó luego por citometría de flujo.

El porcentaje de células BHK21 apoptóticas reveló una disminución estadística cuando se transfectaron con las vacunas con el ARN de SINrep5, de 24 horas a 72 horas después (representativo con SIN-E7/HSP70 $70,3 \pm 3,6\%$ a las 24 horas, $49,3 \pm 4,2\%$ a las 48 horas, $18,0 \pm 3,1\%$ a las 72 horas, $P < 0,001$, ANOVA monofactorial). Las células BHK21 transfectadas con las vacunas con ARN de SINrep5 indujeron un mayor porcentaje después de 24, 48 o 72 horas en comparación con los otros dos grupos de control. No se pudieron encontrar diferencias estadísticas en el porcentaje de apoptosis de diferentes vacunas con el ARN de SINrep5.

Realce de la presentación de E7 a través de la vía del CMH de clase I en las células dendríticas sensibilizadas con células transfectadas con el ARN de SINrep5-E7/HSP70: un posible mecanismo para el realce de la respuesta inmunitaria *in vivo* mediante linfocitos T CD8+ específicos de E7 es la presentación de E7 a través de la vía del CMH de clase I mediante la captación de cuerpos apoptóticos desde las células que expresan diferentes construcciones de E7, también denominado «sensibilización cruzada». Se realizó un experimento de sensibilización cruzada para caracterizar la presentación de E7 por el CMH de clase I en las células dendríticas sensibilizadas con cuerpos apoptóticos de células BHK21 transfectadas con diferentes ARN autorreplicantes. Tal y como se mencionó previamente, las células BHK21 han demostrado tener una eficacia de transfección elevada y estable, y una expresión de E7 similar entre las células transfectadas con diferentes ARN autorreplicantes que contienen la E7. Las células BHK21 transfectadas se incubaron con las CD procedentes de la médula ósea. Las CD se utilizaron de células diana mientras que los linfocitos T CD8+ específicos de E7 sirvieron de células efectoras. Se realizaron los ensayos de LTC con diferentes proporciones de E/D.

Las CD diana incubadas con células BHK21 transfectadas con el ARN de SINrep5-E7/HSP70 indujeron un porcentaje significativamente más alto de lisis específica que las CD incubadas con las células BHK21 transfectadas con el ARN de SINrep5-E7 ($P < 0,001$). Estos resultados sugirieron que las células dendríticas sensibilizadas con los cuerpos apoptóticos que contienen la proteína de fusión E7/HSP70 presentaban el antígeno de E7 a través de la vía del CMH de clase I con más eficacia que las células dendríticas sensibilizadas con los cuerpos apoptóticos que contienen la proteína E7 de tipo silvestre. Así pues, la fusión de la HSP70 con la E7 realzó la respuesta inmunitaria mediante linfocitos T CD8+ específicos de E7; y, sin que la invención se limite a ningún mecanismo particular, el realce fue probablemente a través de una «sensibilización cruzada».

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión para ser usado como vacuna en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno, en donde la molécula comprende:
 - (a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende un polipéptido de calreticulina;
 - (b) opcionalmente, fusionada en fase con la primera secuencia de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico conectora que codifica un péptido conector; y
 - (c) una segunda secuencia de ácido nucleico que está unida en fase a la primera secuencia de ácido nucleico o a la secuencia de ácido nucleico conectora y que codifica un polipéptido o péptido antigénico.
2. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido antigénico comprende un epítipo que se fija a una proteína del CMH de clase I.
3. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el epítipo tiene una longitud entre 8 restos de aminoácidos y 11 restos de aminoácidos.
4. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:
 - (a) la calreticulina es la calreticulina humana;
 - (b) la calreticulina comprende la secuencia descrita en la figura 10B;
 - (c) el polipéptido de calreticulina consiste en la secuencia que va desde el resto 1 al resto 180 de la secuencia descrita en la figura 10B; o
 - (d) el polipéptido de calreticulina consiste en una secuencia que va desde el resto 181 al resto 417 de la secuencia descrita en la figura 10B.
5. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno es un antígeno que está presente en, o que reacciona de forma cruzada con, un epítipo de un organismo o célula patógeno, o un virus.
6. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
 - (a) el virus es un virus de papiloma humano;
 - (b) el organismo patógeno es una bacteria; o
 - (c) la célula patógena es una célula tumoral.
7. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6(a), para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno es el polipéptido E7 del VPH-16 o un fragmento antigénico del mismo, preferiblemente en donde dicho antígeno es una variante no oncogénica del polipéptido E7 del VPH-16.
8. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6(c), para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno es un antígeno asociado a tumor o específico de tumor, o cualquier epítipo antigénico del mismo, preferiblemente en donde el antígeno comprende la proteína HER2/neu o un péptido de la misma.
9. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, unida operativamente a un promotor.
10. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor es un promotor que se expresa en una célula presentadora de antígeno (CPA), preferiblemente una célula dendrítica.
11. Vector de expresión o casete para ser usado como vacuna en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno, en donde dicho vector de expresión o casete comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 operativamente unida a:
 - (a) un promotor; y
 - (b) opcionalmente, otras secuencias reguladoras que regulan la expresión del ácido nucleico en una célula eucariota.

12. Vector de expresión o casete de acuerdo con la reivindicación 11, para ser usado de acuerdo con la reivindicación 11, que es:
- (a) un vector vírico o un plásmido; o
 - (b) un replicón de ARN autorreplicante.
- 5 13. Vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12, para ser usado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el replicón de ARN autorreplicante es un replicón de ARN autorreplicante del virus de Sindbis, preferiblemente SINrep5.
- 10 14. Célula para ser usada como vacuna en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que se ha modificado para comprender una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un casete o vector de expresión para realzar una respuesta inmunitaria específica de antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
- 15 15. Célula de acuerdo con la reivindicación 14, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 14, que:
- (a) expresa la molécula de ácido nucleico; y/o
 - (b) es una CPA, preferiblemente una célula dendrítica, un queratinocito, un macrófago, un monocito, un linfocito B, un microglíocito, un astrocito o una célula endotelial activada.
16. Partícula para ser usada como vacuna en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un casete o vector de expresión para realzar una respuesta inmunitaria específica de antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
- 20 17. Partícula de acuerdo con la reivindicación 16, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende un material adecuado para la introducción en una célula o en un animal mediante el bombardeo de partículas.
18. Partícula de acuerdo con la reivindicación 17, para ser usada de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el material es oro.
- 25 19. Composición farmacéutica para ser usada como vacuna en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un vector de expresión o casete de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, una célula de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, una partícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o cualquier combinación de lo anterior y un excipiente farmacéutica e inmunitariamente aceptable.
- 30 20. Utilización de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un vector de expresión o casete de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, una célula de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, una partícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, para la fabricación de una vacuna que realce una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto.
- 35 21. Utilización de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la respuesta está mediada al menos en parte por anticuerpos.
22. Procedimiento para fabricar una vacuna para ser usada en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, que comprende la manipulación *ex vivo* de células presentadoras de antígeno (CPA) mediante
- 40 (a) la transfección de la CPA con un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13; o
- (b) estimular («sensibilizar») la CPA con un lisado celular de células transfectadas con el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13;
- en donde:
- 45 (i) las CPA a manipular *ex vivo* son histocompatibles (compatibles según el CMH) con el sujeto y se someten a cultivo celular o se aíslan del propio sujeto; y
- (ii) las CPA manipuladas son para la administración al sujeto.
23. Utilización de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el sujeto es un humano.

24. Utilización de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fármaco es para la administración al sujeto mediante una vía intramuscular, intradérmica o subcutánea.
25. Utilización de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fármaco o la composición comprende la molécula de ácido nucleico, vector de expresión, casete o partícula, y el fármaco o composición es para la administración mediante inyección biolística.
26. Utilización de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fármaco es para la administración por vía intratumoral o peritumoral.
27. Utilización de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un vector de expresión o casete de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, una célula de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, una partícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 para la fabricación de un fármaco que incremente el número o la actividad lítica de los LTC CD8+ específicos de un antígeno concreto en un sujeto, en donde:
- (a) la molécula de ácido nucleico, vector de expresión, casete, célula o partícula comprende el antígeno seleccionado; y
- (b) el antígeno seleccionado comprende un epítipo que se fija a las proteínas del CMH de clase I, y es presentado sobre la superficie celular por las proteínas del CMH de clase I.
28. Utilización de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un vector de expresión o casete de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, una célula de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, una partícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, para la fabricación de un fármaco que inhiba el crecimiento o la prevención del recrecimiento de un tumor en un sujeto, en donde la molécula de ácido nucleico, vector de expresión, casete, célula o partícula comprende uno o más epítopos específicos de tumor o asociados a tumor presentes en el tumor del sujeto.
29. Utilización de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el fármaco se ha de administrar por vía intratumoral o peritumoral.
30. Utilización de acuerdo con la reivindicación 28 o 29, en donde el fármaco se ha de administrar antes, a la vez o después de administrar al sujeto una segunda composición que tiene actividad antiangiogénica.
31. Utilización de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la composición antiangiogénica es angioestatina, endoestatina o TIMP-2.
32. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, en donde el sujeto se ha de tratar adicionalmente con radioterapia o quimioterapia.
33. Productos que contienen una composición de acuerdo con la reivindicación 19, y una composición que tiene actividad antiangiogénica para inhibir el crecimiento o prevenir el recrecimiento de un tumor en un sujeto, en donde ambas composiciones se han de coadministrar.

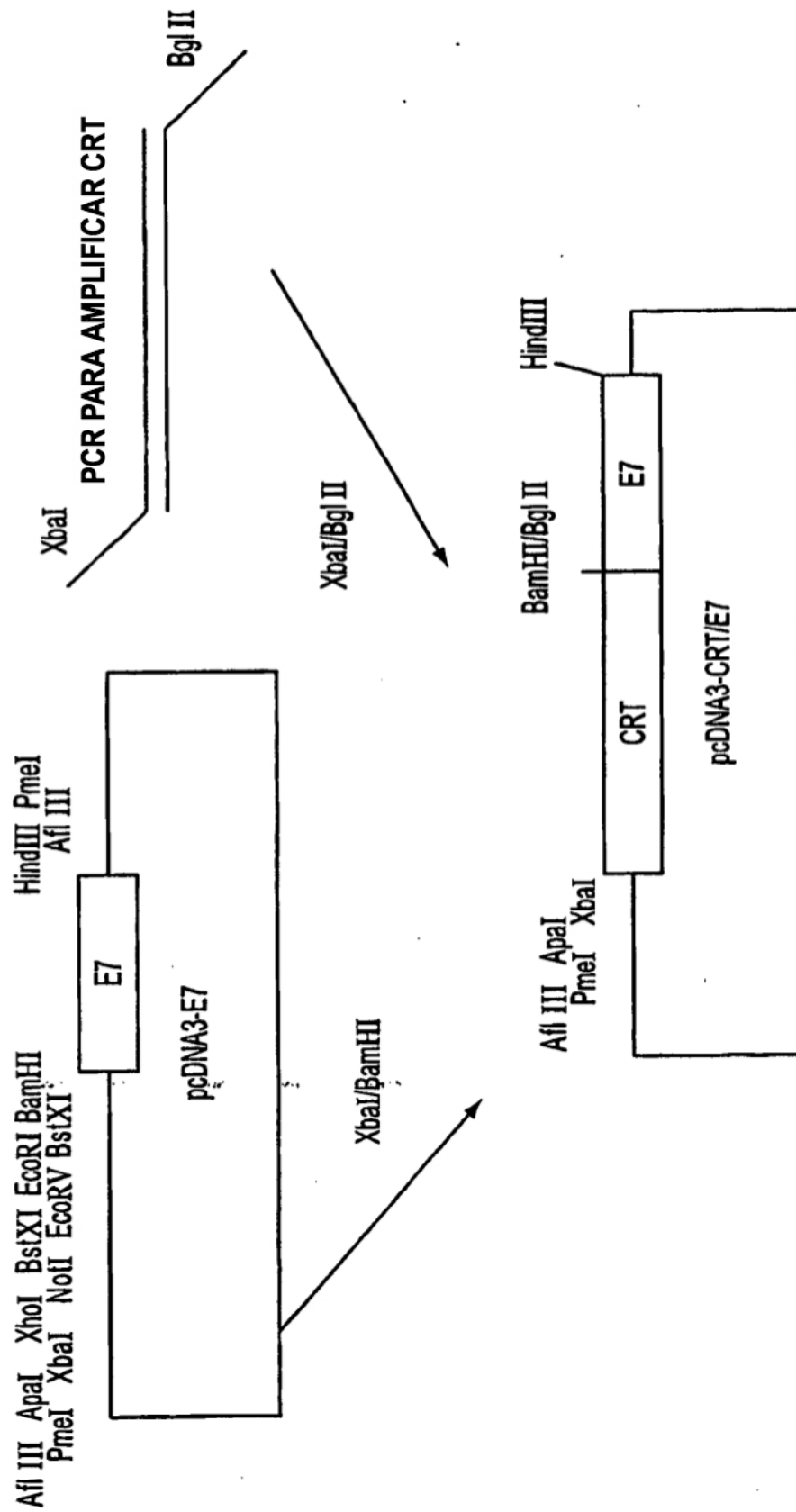
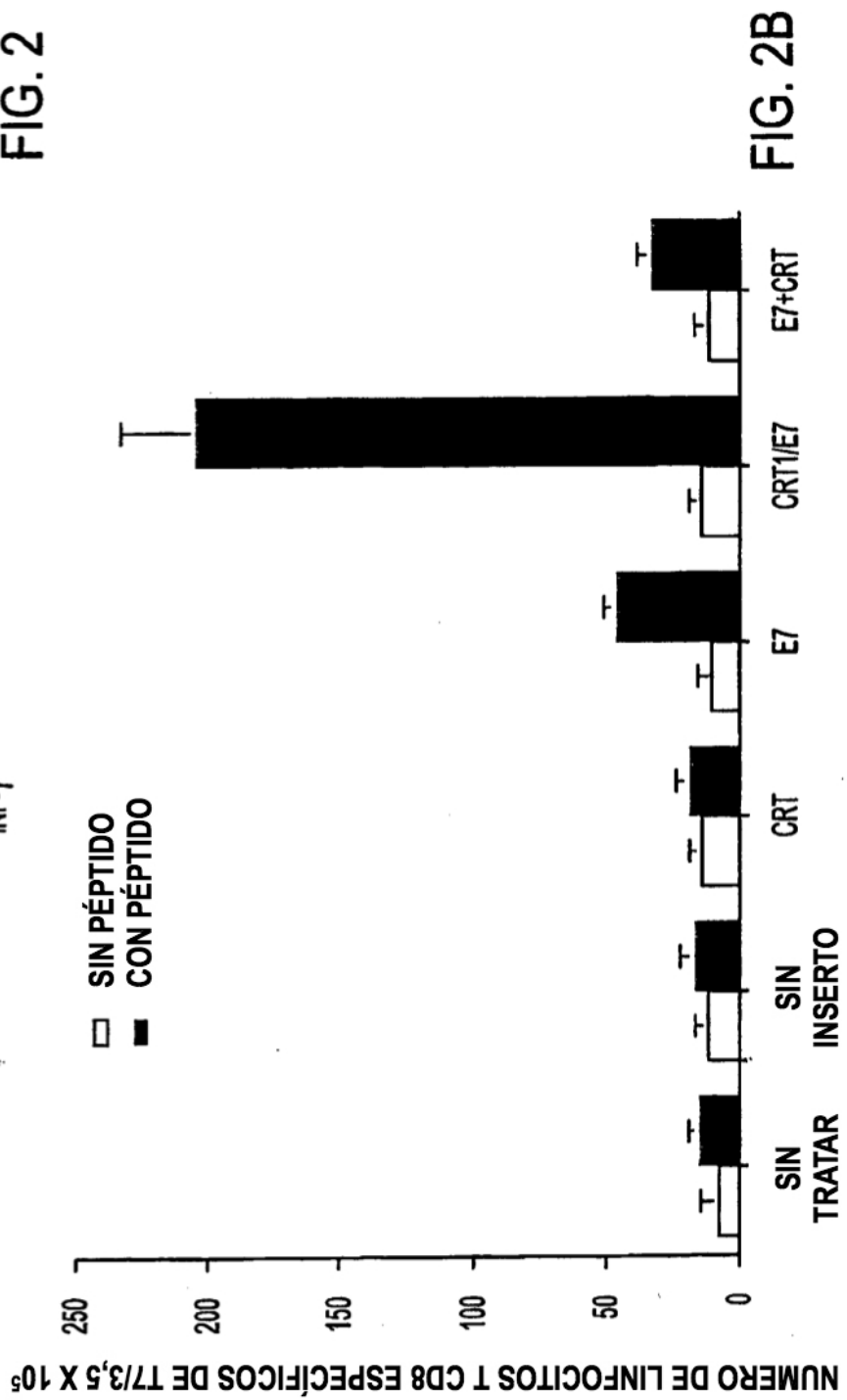
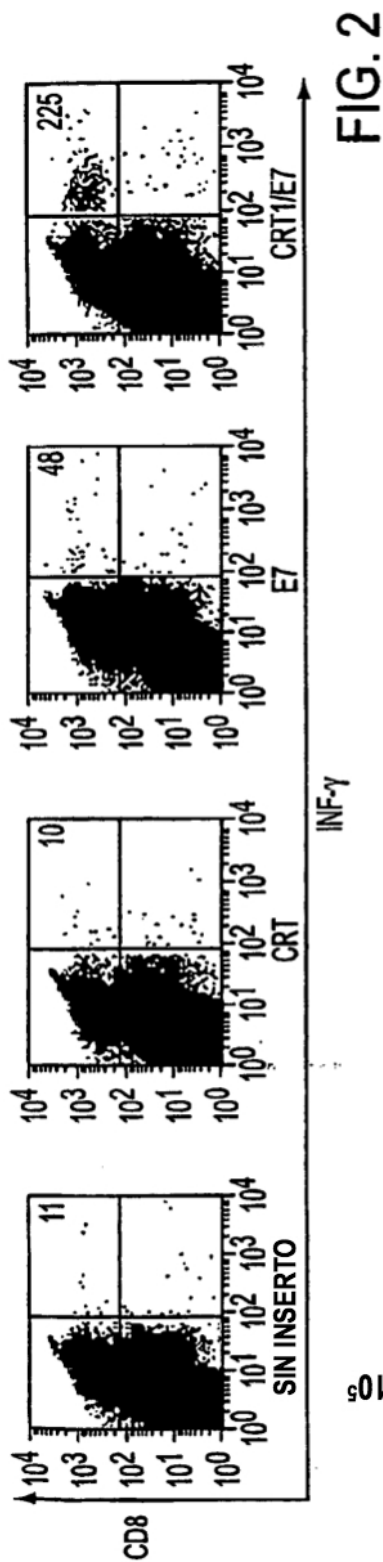


FIG. 1



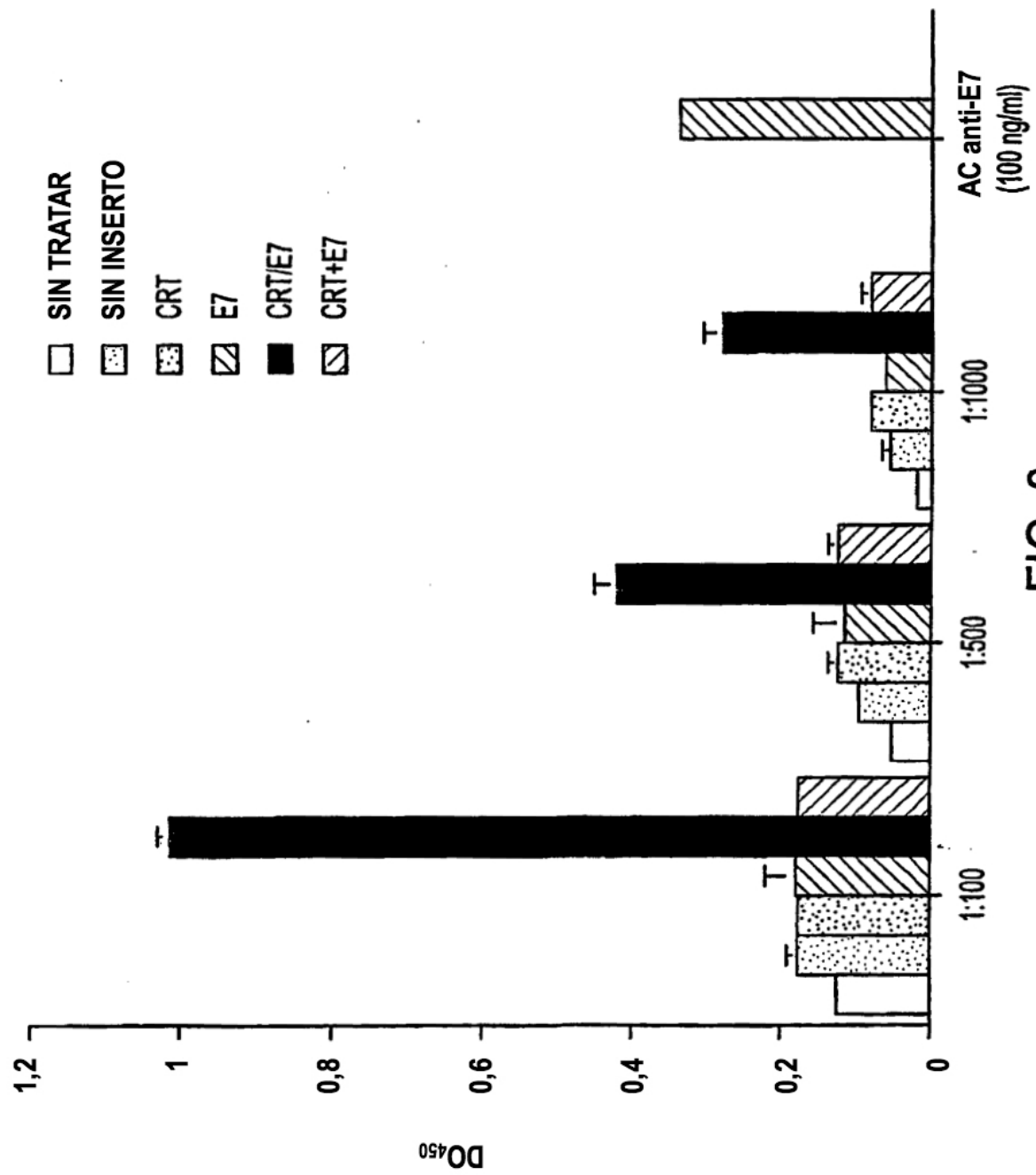


FIG. 3

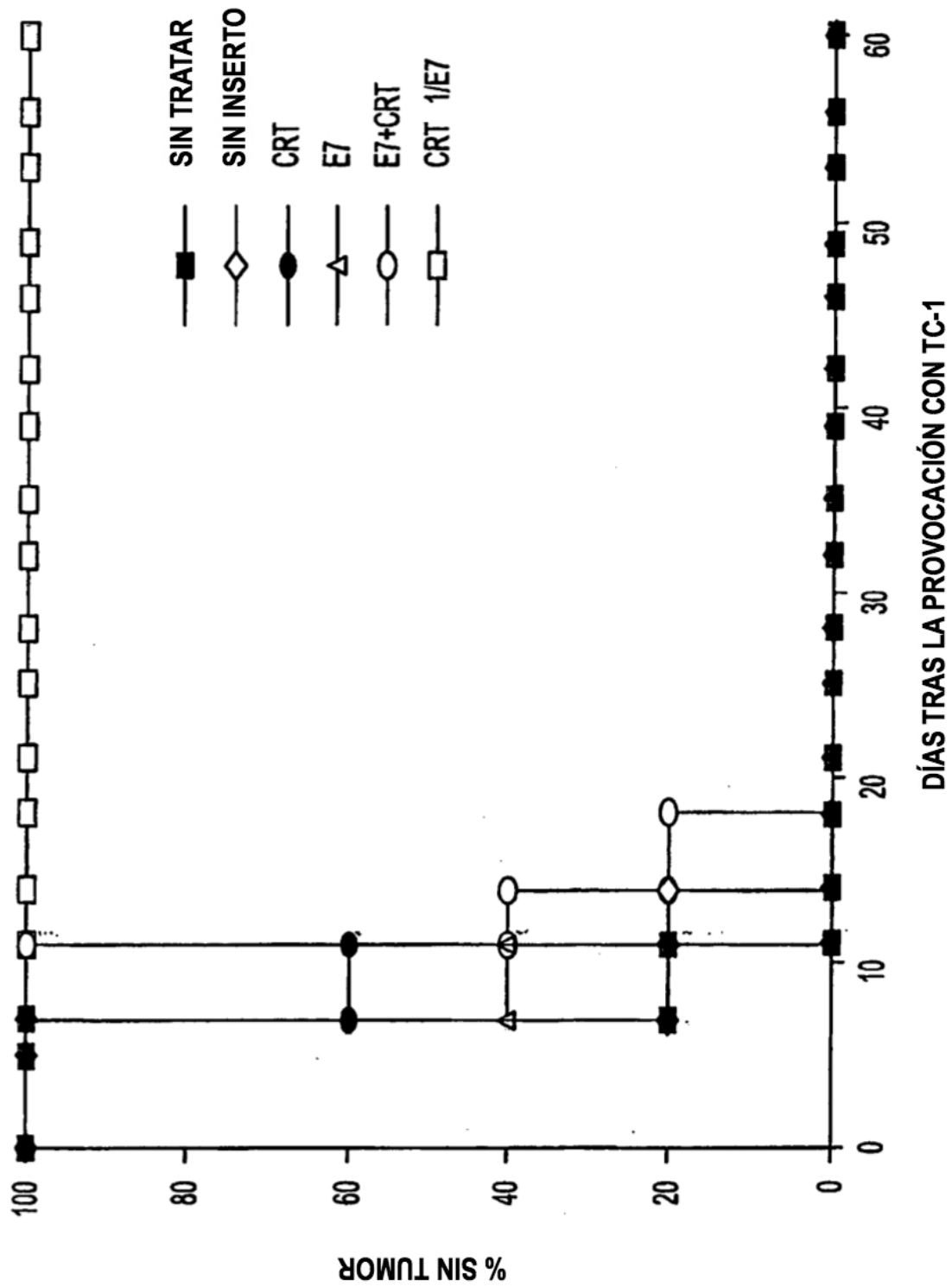


FIG. 4

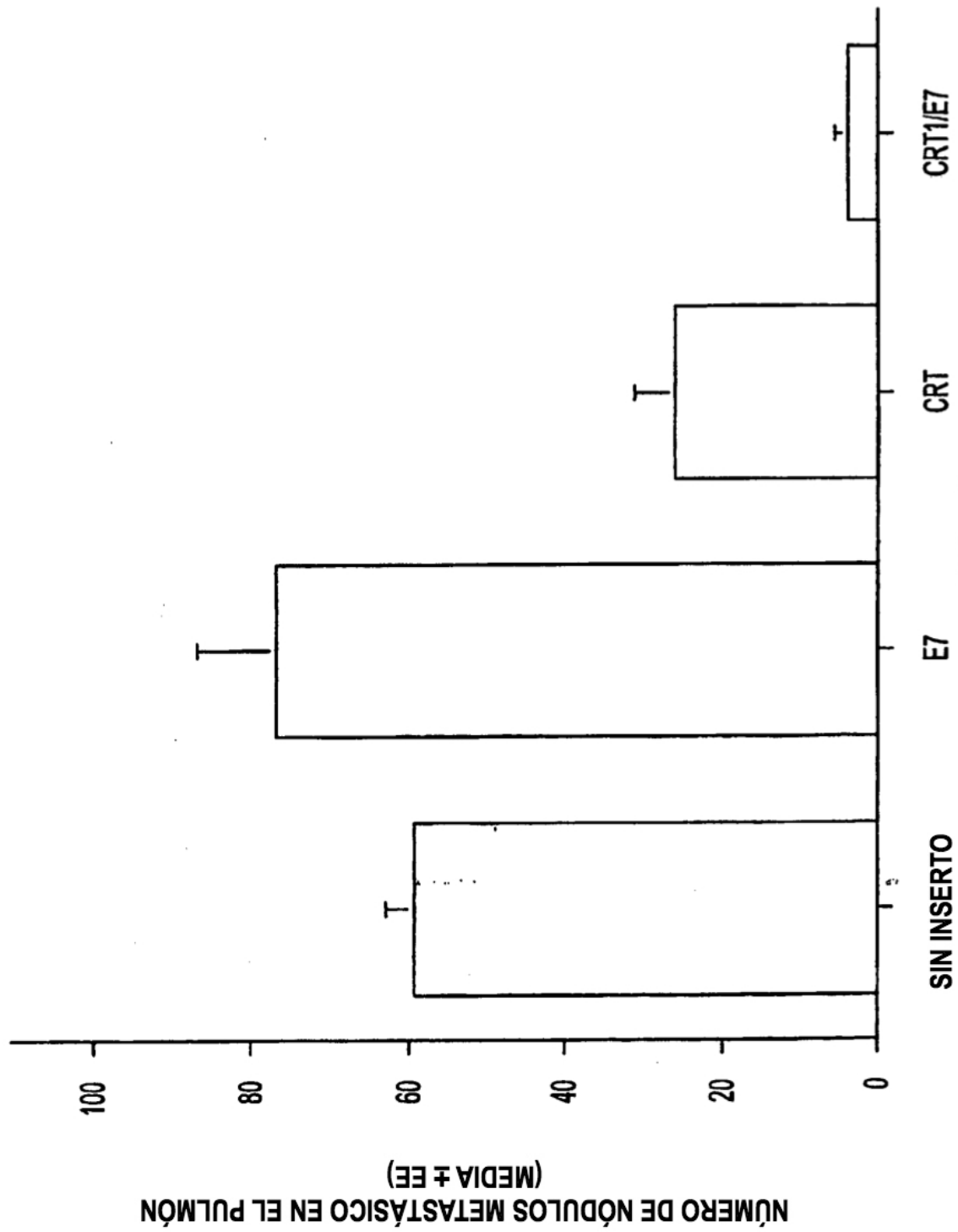


FIG. 5

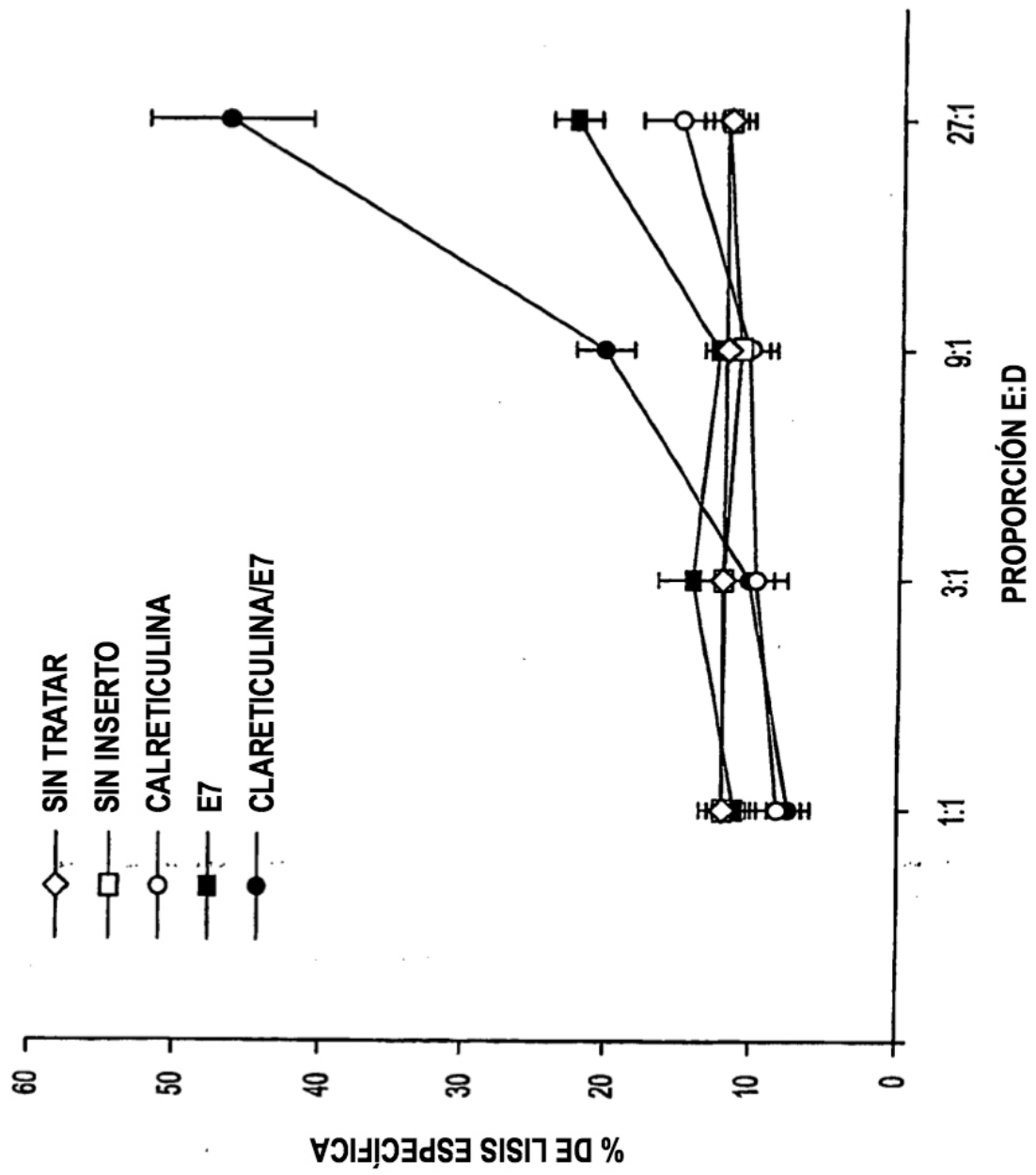


FIG. 6

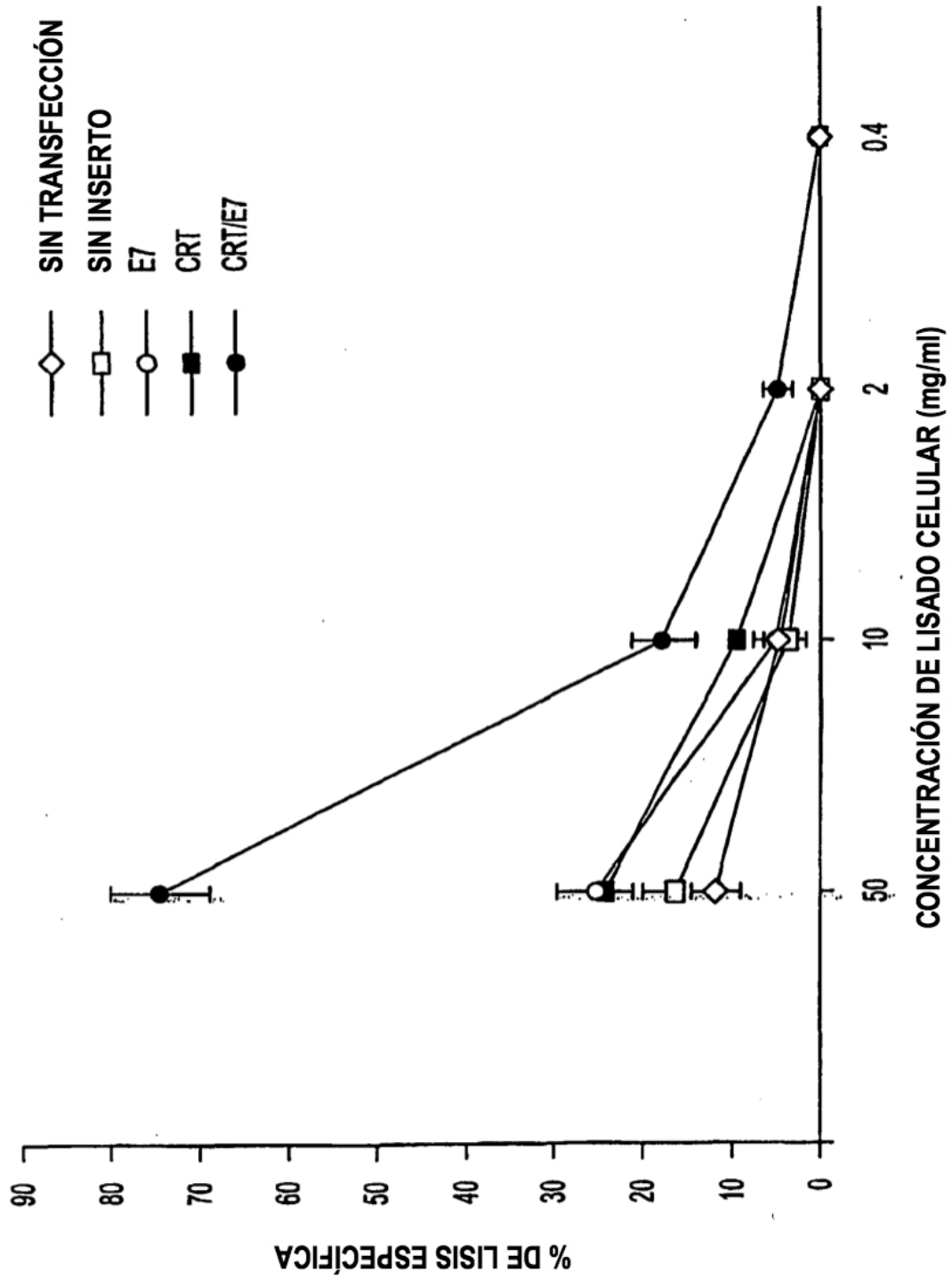


FIG. 7

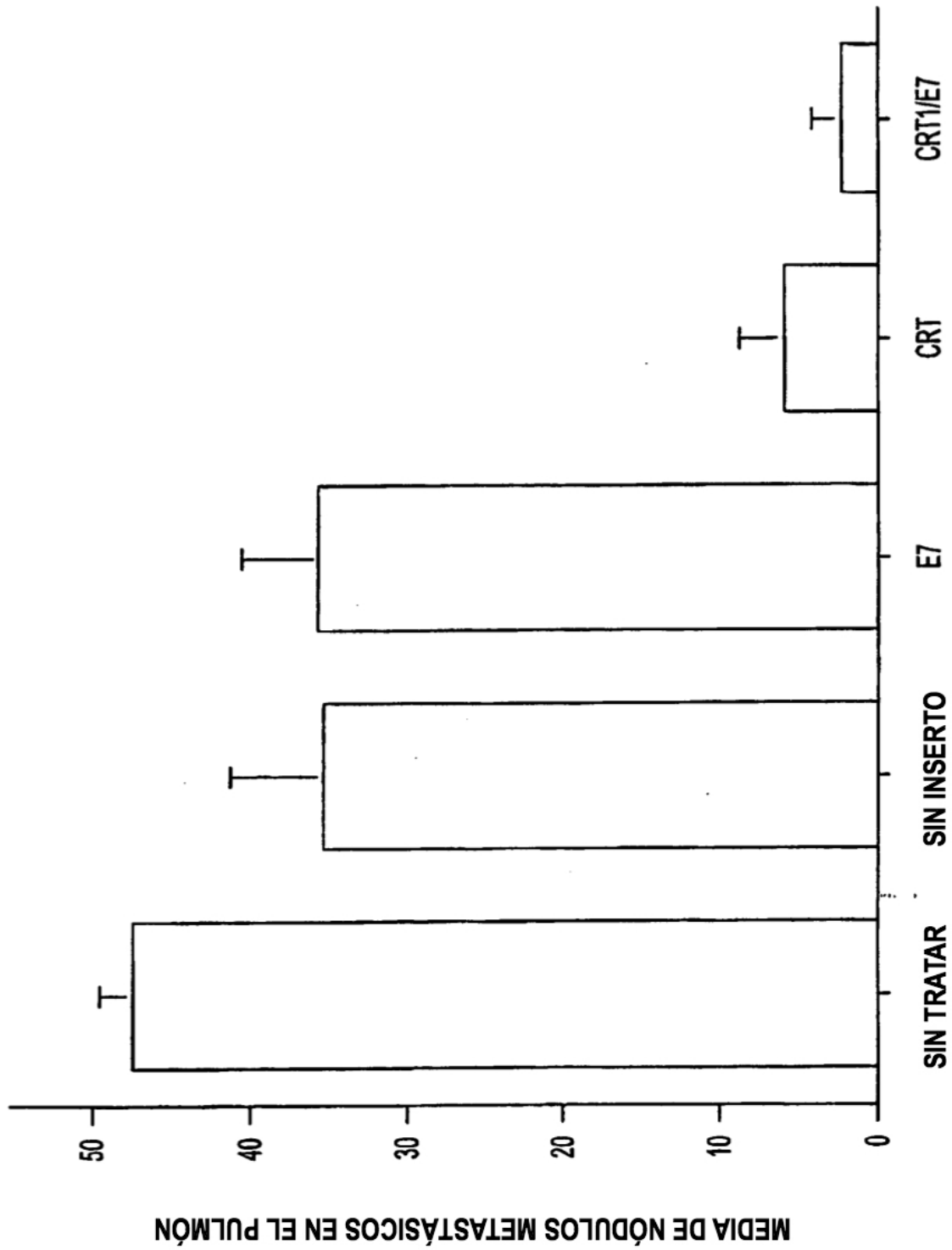
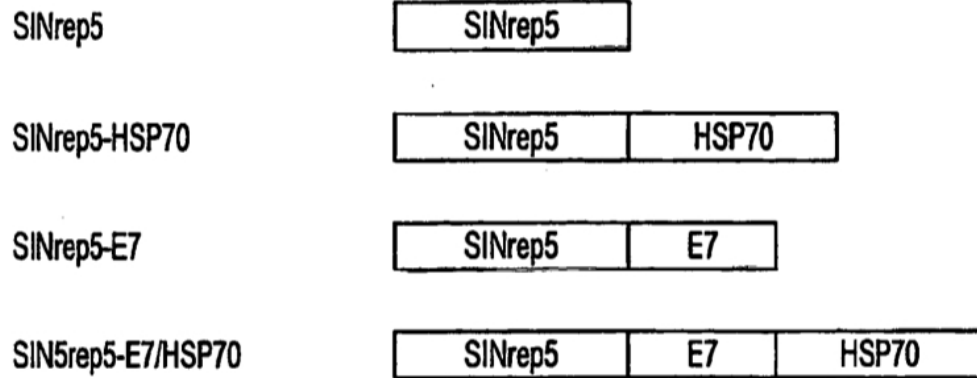


FIG. 8

CONSTRUCCIONES DE ADN



TRANSCRITOS DE ARN

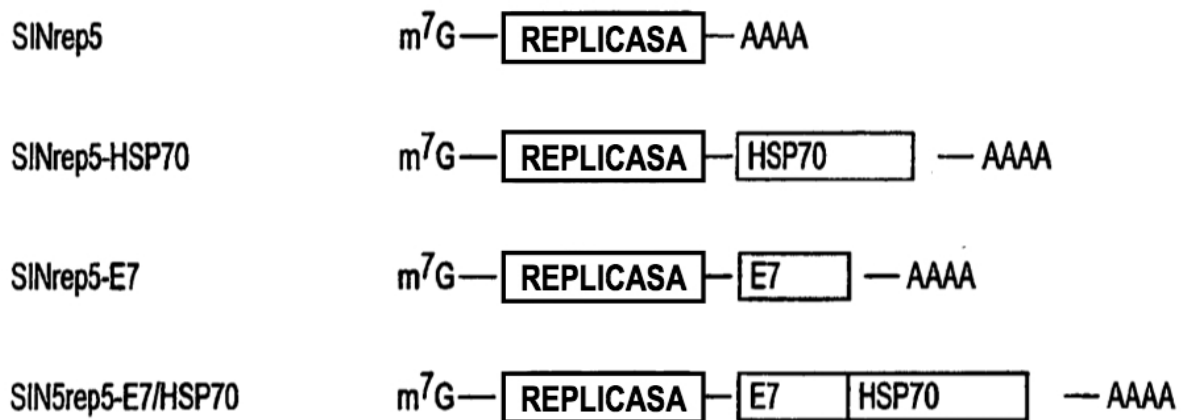


FIG. 9

```

1      gtccgtactg cagagccgct gccggaggggt cgttttaaaagg gcccgcgcttg ccgccccctc
61     ggcccgccat gctgctatcc gtgccgctgc tgcctggcct cctcggcctg gccgtcgccg
121    agcccgccgt ctacttcaag gagcagtttc tggacggaga cgggtggact tcccgctgga
181    tcgaatccaa acacaagtca gattttggca aattcgttct cagttccggc aagttctacg
241    gtgacgagga gaaagataaa ggtttgcaga caagccagga tgcacgcttt tatgctctgt
301    cggccagttt cgagcctttc agcaacaaaag gccagacgct ggtggtgcag ttcacgggtga
361    aacatgagca gaacatcgac tgtggggggc gctatgtgaa gctgttttct aatagtttgg
421    accagacaga catgcacgga gactcagaat acaacatcat gtttggctcc gacatctgtg
481    gccctggcac caagaagggt catgtcatct tcaactacaa gggcaagaac gtgctgatca
541    acaaggacat ccgttgcaag gatgatgagt ttacacacct gtacacactg atctgtcggc
601    cagacaacac ctatgagggt aagattgaca acagccaggt ggaagtcggc tccctggaaag
661    acgattggga ctctctgcca cccaagaaga taaaggatcc tgaatgttca aaaccggaaag
721    actgggatga gcggggccaa atcgatgac cctgatgcta agaagccgga ggaaggtgag
781    agcccgagca tatccctgac cctgatgcta agaagccgga ggaaggtgag ggaaggtgag
841    acggagagtg ggaaccccca gtgattcaga accctgagta caaggtgag tggaaagccc
901    ggagatcga caaccagat tacaaggga cttgggatcca ccagaaatt gacaacccc
961    agtattctcc cgatcccagt atctatgctt accatcttgg acaacttctt tggcgtgctg
1021   tctggcaggt caagtctggc accatcttgg gagacttgg gcgtaacaaa ggcagcagag
1081   acgctgagga gtttggcaac gagacttgg gagacttgg gcgtaacaaa ggcagcagag
1141   aggacaaaca ggacgaggag cagaggctta agaggagga agaagacaa aaacgcaaaag
1201   aggaggagga ggcagaggac aaggaggatg agaggagga atgaggacaa agatgaggat
1261   agaggagcaa ggaggaaagat gaggggaaag atgtccccgg ccaggccaaag gacgagctgt
1321   agagaggcct gcctccaggg ctggactgag gcctgagcgc tctgcccga gagcttgccg
1381   cgccaaataa tgrctctgtg agactcgaga actttcatct tttccaggc tggttcggat
1441   ttgggggtgga ttttggtttt gtccccctcc tccactctcc cccacccctt cccgcccc
1501   tttttttttt tttttaaact ggtattttat cctttgattc tcttccagcc ctacacctg
1561   gttctcatct tcttgatca acatcttttc ttgctctgtt gcccttctc tcatctctta
1621   gctccctccc aacctggggg gcagtgggtg ggagaagcca caggcctgag atttcatctg
1681   ctctccttcc tggagcccag aggaggggcag cagaaggggg tgggtgtctc aacccccag
1741   cactgaggaa gaacgggggt ctctcatctt caccctccc ttttcccc gccccagga
1801   ctggggcact tctgggtggg gcagtgggtc ccagattggc tcaactgag aatgtaagaa
1861   ctacaaacaa aatttctatt aaattaaatt ttgtgtctc 1899

```

FIG. 10A

```

1  NLLSVPLLLG LGLAVAEPA VYFKEQFLDG DGWTSRWIES KHKSDFGKFV LSSGKFYGDE
61  EKDKGLQTSQ DARFYALSAS FEPFSNKGQT LVVQFTVKHE QNIDCGGGYV KLFPNSLDQT
121 DMHGDSEYNI MFGPDICGPG TKKVHVIFNY KGKNVLINKD IRCODEFTH LYTLIVRPDN
181 TYEVKIDNSQ VESGSLEDDW DFLPPKKIKD PDASKPEDWD ERAKIDDPD SKPEDWDKPE
241 HIPDPDAKKP EDWDEEMDGE WEPPVIQNPE YKGEWKPRQI DNPDYKGTWI HPEIDNPEYS
301 PDPSIYAYDN FGVGLGLDLWQ VKSGTIFDNF LITNDEAYAE EFGNETWGVV KAAEKQMKDK
361 QDEEQRLLKEE EEDKKRKEE EAEDKEDDED KDEDEEDED KEEDEEDVP GQAKDEL 417

```

FIG. 10B