

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 329**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2003 E 03808718 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 1549750**

54 Título: **Moléculas modulares de transporte de antígenos (moléculas MAT) para la modulación de reacciones inmunitarias, constructos, métodos y usos correspondientes**

30 Prioridad:

11.10.2002 EP 02022774

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

04.08.2015

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
(100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**LAMPING, NORBERT;
RETO, CRAMERI;
FLÜCKIGER, SABINE y
DAIGLE, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 542 329 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

Moléculas modulares de transporte de antígenos (moléculas MAT) para la modulación de reacciones inmunitarias, constructos, métodos y usos correspondientes

5

Ámbito técnico de la presente invención

La presente invención se refiere a la estimulación e inhibición del sistema inmunitario para la profilaxis, la terapia o el diagnóstico de enfermedades acompañadas de un sistema inmunitario no muy fuertemente estimulado o demasiado estimulado. Entre estas enfermedades cabe citar infecciones, tumoraciones, alergias, enfermedades autoinmunes, reacciones de rechazo a trasplantes, etc. El núcleo de la presente invención es un nuevo método que consiste en administrar una molécula MAT que influye en el sistema inmunitario y que consta al menos de los tres componentes siguientes:

10

1. un módulo de translocación que hace que la molécula MAT pueda penetrar en las células desde el exterior,
2. un módulo de selección como diana intracelular, que hace que la molécula MAT se procese en el interior de la célula, produciendo una respuesta inmunitaria modificada o una presentación modificada del antígeno, y
3. un módulo de antígeno, que determina la especificidad de la respuesta inmunitaria modulada.

15

La combinación de estos tres elementos en una molécula MAT permite la modulación selectiva y específica del sistema inmunitario del individuo tratado o bien una presentación modificada del antígeno mediante la célula que presenta antígenos.

20

Estado técnico

Procesamiento de antígenos mediante células que presentan antígenos

25

El procesamiento de antígenos mediante células que presentan antígenos (APC) tiene lugar a través de dos vías diferentes. Los antígenos que aparecen intracelularmente son presentados en la superficie celular por moléculas MHC I (Major Histocompatibility Complex class I, MHC class I [*complejo principal de histocompatibilidad clase I*]), mientras que los antígenos extracelulares son presentados en la superficie celular a través de moléculas MHC II (Major Histocompatibility Complex class II, MHC class II [*complejo principal de histocompatibilidad clase II*]). Ambos mecanismos inician una reacción inmunitaria del huésped al antígeno. El camino que toma el antígeno desde su absorción en la célula hasta la presentación en la superficie celular, en forma de un complejo MHCII-antígeno, transcurre a través de diferentes orgánulos celulares, entre otros a través del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi, de la red trans-Golgi, de lisosomas, endosomas, y a través de "compartimentos de MHC de clase II" (MIIC). En el caso de la presentación de antígenos mediada por MHC II los MIIC juegan un papel importante. En estos orgánulos de la célula las moléculas de MHC II se cargan de antígenos de bajo peso molecular o de fragmentos proteolíticos de proteínas. En este proceso la "cadena invariante" (también llamada cadena gamma de MHC II o Ii), unida al principio a la molécula MHC II, se degrada proteolíticamente y bajo la regulación de diferentes proteínas, que se unen de manera directa o indirectamente a MHC II, el antígeno se une a la molécula MHC II [1]. Entre estas moléculas reguladoras se hallan HLA-DM, HLA-DO, LAMP-1, LAMP-2, CD63, CD83, etc. Hasta la fecha la función exacta de estas proteínas está en parte por aclarar, pero muchas de ellas presentan secuencias señalizadoras que promueven su transporte hacia los lisosomas, los endosomas, la red trans-Golgi, los MIIC, etc. [2-4]. En el caso de las reacciones proteolíticas - necesarias para presentar el antígeno en las moléculas de MHC II - interviene una serie de proteasas. A las proteasas presentes en los MIIC pertenecen, entre otros, diferentes miembros de la familia de la catepsinas, tales como p.ej. la catepsina S y la catepsina L [1].

30

35

40

45

Selección de dianas y secuencias de acceso

Las secuencias de aminoácidos que tienen la propiedad de acumularse selectivamente en un sitio interior o exterior de una célula o en un orgánulo celular determinado se denominan con frecuencia secuencias de acceso. A este respecto cabe destacar que pueden distinguirse diferentes tipos de selección de dianas. En concreto se distingue entre selección de dianas intracelulares y extracelulares. Para la selección de dianas extracelulares se usan p.ej. anticuerpos que se unen desde fuera a estructuras directamente accesibles en la superficie celular, p.ej. a la parte extracelular de proteínas de membrana. Un anticuerpo que fije una proteína a la superficie celular de células tumorales se puede acoplar p.ej. a una citotoxina. Entonces este anticuerpo hace que la citotoxina se dirija hacia la célula tumoral como diana extracelular, con lo cual ésta puede destruirse selectivamente. Este tipo de selección de dianas es básicamente distinto de la selección de dianas intracelulares, en la cual deben superarse con frecuencia membranas intracelulares o en la cual la secuencia de acceso es fijada por receptores intracelulares y así penetra p.ej. en determinados orgánulos celulares, o en la cual la secuencia de acceso puede penetrar a través de canales especiales, formados por proteínas especiales, en el orgánulo celular del cual es específica. En lo sucesivo, cuando en la presente solicitud de patente se habla de una secuencia de acceso o de un módulo de selección de dianas se refiere casi siempre a selección de dianas intracelulares y no extracelulares. Además, en la presente solicitud de patente la selección de dianas intracelulares no se refiere a cualquier tipo de diana intracelular, sino solo a las que sirven para transportar moléculas hacia orgánulos o regiones intracelulares que intervienen en la preparación, procesamiento y/o unión de antígenos a moléculas de MHC. Estos orgánulos o regiones intracelulares son p.ej. el

50

55

60

65

retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, la red trans-Golgi, endosomas, lisosomas y MHC. Las secuencias de acceso derivadas de distintas proteínas están descritas en la literatura [1-5].

Translocación y secuencias de translocación

5 Asimismo se conocen de la literatura numerosas secuencias de aminoácidos, derivadas en concreto de virus, p.ej. VIH-Tat o la proteína VP22 procedente del virus del herpes simple, que facilitan el transporte de proteínas, péptidos y otras clases de sustancias, como por ejemplo ácidos nucleicos o sustancias farmacéuticamente activas, hacia el interior de la célula. Para ello estas secuencias, llamadas translocadoras, se unen mediante enlaces covalentes o no
10 covalentes a las moléculas que deben transportarse (también llamadas moléculas de carga). Luego los compuestos resultantes de la unión de la secuencia translocadora a la molécula de carga pueden añadirse extracelularmente a las células. Después la secuencia de translocación hace llegar la molécula transportada al interior de la célula. Este principio está igualmente descrito en numerosos trabajos, especialmente para la secuencia de VIH-Tat [6-8].

15 Aunque era posible y estaba previsto usar un antígeno como molécula de carga, con la única ayuda de los agentes de translocación conocidos aún no se podía generar una respuesta inmunitaria tan selectiva y dosificada en un individuo como sería deseable para determinados fines - por ejemplo la desensibilización de alergias. Por lo tanto hacen falta otros procedimientos para conseguir una modulación inmunitaria selectiva.

20 Von Bergen J. y otros, Immunol. Rev., 1999, 172, 87-96, resumen los conocimientos hasta el año 1999 en el campo de la selección de antígenos dirigidos contra dianas. Según este artículo, para la selección de antígenos dirigidos a las moléculas MHC II se siguen dos estrategias diferentes: el uso de constructos de ADN y la absorción selectiva de antígenos, mediante receptores, por células APC que expresan los receptores correspondientes.

25 Sheldon K. y otros, Proc. Natl. Acad. Science U.S.A., 1995, 92 (6), 2056-2060, se refieren al uso de oligómeros. Las moléculas ahí descritas permiten una importación de determinadas secuencias desde la zona extracelular hacia el núcleo de la célula.

Objeto de la presente invención

30 Por tanto la presente invención tiene por objeto proporcionar agentes para llevar selectivamente cualquier tipo de antígenos muy diversos a su lugar de procesamiento, del modo que sea más aprovechable con fines diagnósticos y terapéuticos.

35 Solución del problema

La presente invención ofrece el uso de moléculas transportadoras de antígenos que permiten dirigir antígenos hacia las células de manera muy selectiva, para conseguir una reacción inmunitaria eficiente y específica. En primer lugar estas moléculas permiten el transporte eficiente de antígenos desde el espacio extracelular hacia el espacio
40 intracelular de la célula y segundo lugar que los antígenos, al llegar al interior de la célula, entren eficazmente en los orgánulos celulares, donde siguen procesándose para la presentación del antígeno. Este proceso en dos etapas se puede emplear de manera muy general para modular selectiva y efectivamente la reacción inmunitaria de un sujeto.

45 Como herramienta para lograr estos efectos se desarrollaron unas moléculas especiales, designadas en lo sucesivo en esta solicitud de patente como "moléculas modulares transportadoras de antígenos" o moléculas MAT. Estas moléculas MAT y los respectivos ácidos nucleicos, vectores, células, líneas celulares, vesículas, inmunoglobulinas, así como los usos y procedimientos de la presente invención referidos a dichos componentes o relacionados funcionalmente con ellos, se caracterizan con mayor detalle en las reivindicaciones.

50 Para la resolución del objetivo se prevé una combinación no descrita hasta la fecha, constituida por al menos tres módulos que forman una nueva clase de moléculas designadas como MAT (moléculas modulares transportadoras de antígenos). Estos tres módulos incluyen al menos un módulo de translocación, al menos un módulo de selección de diana y al menos un módulo de antígeno. Los tres módulos distintos se acoplan entre sí por medio de enlaces covalentes o no covalentes. La molécula MAT resultante se puede administrar directamente a un sujeto para influir
55 en su reacción inmunitaria contra los antígenos contenidos en la molécula MAT. Alternativamente también pueden tratarse células in vitro con moléculas MAT y a continuación administrar las células así tratadas al sujeto. Durante este proceso los módulos de translocación hacen que la molécula MAT pueda penetrar en la célula y los módulos de selección de diana que la molécula MAT se procese intracelularmente produciendo una respuesta inmunitaria e identificando los antígenos en el módulo de antígeno contra el cual se dirige la reacción inmunitaria. Una ventaja esencial de este nuevo procedimiento de modulación de la respuesta inmunitaria de un individuo es, sobre todo, su aplicabilidad universal, es decir la posibilidad de trabajar con los más diversos antígenos, con diferentes módulos de translocación y con distintos módulos de selección de diana. Además, gracias al uso de un módulo de translocación, el método no es específico del tejido o de la célula, sino universalmente adecuado para la modulación inmunitaria de casi todos los tipos de células. Otra ventaja es la estructura modular de la molécula MAT, que permite adaptar la
60 molécula MAT rápidamente a los respectivos requerimientos médicos. También puede variarse la alineación exacta de los tres componentes de la molécula MAT y el tipo de unión entre los mismos, siempre que en la molécula MAT

haya al menos un módulo de cada uno de los tres tipos. En cuanto a los antígenos el método no tiene ninguna limitación. Se puede usar p.ej. para activar el sistema inmunitario de un individuo contra agentes patógenos, tales como p.ej. virus, bacterias, parásitos etc., es decir de manera muy general como vacuna. Además el método puede utilizarse para activar el sistema inmunitario contra células degeneradas tales como p.ej. las células tumorales, etc. Pero por otro lado también se puede usar para desensibilizar el sistema inmunitario de un sujeto frente a alérgenos como p.ej. el polen, el pelo de animales, los ácaros de polvo doméstico, el veneno de insectos, etc. o para suprimir selectivamente el sistema inmunitario, p.ej. en caso de reacciones autoinmunes como p.ej. artritis, reuma, diabetes, LES ("lupus eritematoso sistémico"), etc. y para eliminar reacciones de rechazo de trasplantes. Otras enfermedades no citadas explícitamente, que van acompañadas de una reacción inmunitaria demasiado fuerte o demasiado débil, también se pueden tratar con las moléculas MAT de la presente invención.

Hasta ahora en el estado técnico se consideraba a menudo muy desfavorable que las secuencias de translocación no fueran específicas para determinados tipos de células, sino igualmente efectivas para todas las clases [9]. Sin embargo en la presente invención la funcionalidad universal de los módulos de translocación es una gran ventaja no reconocida en el estado técnico anterior. En el estado técnico previo se había intentado con frecuencia proteger las "moléculas de carga" - que se infiltran en las células con la ayuda de las secuencias de translocación - contra su degradación proteolítica dentro de la célula [9]. En la presente invención se desea explícitamente justo lo contrario, pues es ventajoso para el desarrollo de la misma, es decir para una presentación de antígeno eficiente. Por tanto en la presente invención se emplean módulos de selección de dianas que facilitan selectivamente el transporte de los módulos de antígeno en los compartimentos celulares, donde se degradan proteolíticamente.

Las secuencias más conocidas de aminoácidos que según la presente invención se pueden emplear como módulo de translocación son las secuencias VIH-Tat y VP22. Se ha descrito que estas secuencias producen tanto una translocación a través de la membrana celular como un transporte hacia el núcleo de la célula [7]. Este transporte hacia el núcleo de la célula no es deseable según la presente invención, ya que en él no hay ningún procesamiento de antígenos y por consiguiente no tiene lugar una presentación eficiente de antígenos. Este problema, no resuelto hasta ahora, se soluciona en la presente invención mediante el uso de un módulo de selección de dianas que hace que la molécula MAT no sea transportada intracelularmente hacia el núcleo de la célula, sino selectivamente a los orgánulos donde tiene lugar el procesamiento de antígenos o la carga de moléculas MHC con antígenos. Por tanto el módulo de translocación intracelular de las moléculas MAT según la presente invención supera un inconveniente propio de las proteínas de fusión de Tat-antígeno conocidas hasta la fecha en el estado técnico.

En el estado precedente también se conocen proteínas de fusión que constan de una secuencia de selección de dianas, p.ej. la cadena invariante de la molécula MHC II, y de un antígeno. Sin embargo estas proteínas de fusión no pueden penetrar de manera eficaz en las células que presentan antígenos. Para ello, en caso de tener que usarlas en la inmunización de un sujeto, se necesita adicionalmente un coadyuvante que facilite la absorción de la proteína de fusión por la célula. Estos coadyuvantes - p.ej. un aceite mineral, extractos de micobacterias o un adyuvante de Freund - tienen sin embargo efectos secundarios no deseados, como p.ej. reacciones de inflamación locales. En comparación con las vacunas usuales, las moléculas MAT utilizadas ahora en la presente invención tienen la ventaja de estar acopladas directamente a un módulo de translocación fisiológicamente muy compatible que promueve la absorción en las células de manera muy efectiva. Gracias a ello cabe la posibilidad de prescindir total o parcialmente de coadyuvantes. Por consiguiente en las inmunizaciones con moléculas MAT aparecerán muchos menos efectos secundarios no deseados.

Se sabe desde hace tiempo que los antígenos presentados intra o extracelularmente en MHC I incitan una respuesta inmunitaria citotóxica, pero no una respuesta inmunitaria humoral muy proyectiva. Sin embargo, mediante el uso de moléculas MAT pueden añadirse extracelularmente los antígenos contenidos en el módulo de antígeno, aunque éstos actúan como antígenos intracelulares, pues el módulo de translocación transporta el antígeno hacia el espacio intracelular y el módulo de selección de dianas influye en el transporte intracelular del antígeno produciendo una respuesta inmunitaria humoral. Con este nuevo proceso se puede conseguir la fuerte inducción de una respuesta inmunitaria humoral con antígenos añadidos extracelularmente (moléculas MAT), tal como se pretendía desde hace muchos años.

En el artículo sinóptico de van Bergen, J. y otros, 1999, Immunological Reviews, 172, 87-96, se describen distintas estrategias para dirigir antígenos a moléculas MHC de clase II. Estas estrategias están basadas por un lado en la endocitosis de los antígenos mediada por receptores. Por otro lado se discuten las posibilidades de la biología molecular para la dirección endógena de los antígenos hacia las dianas. En el artículo de Sheldon, K. y otros, PNAS, 1995, 92, 2056-2060, se describen nuevas moléculas denominadas loligómeros. Se trata de moléculas compuestas por señales de translocación fusionadas con una molécula marcadora. Estos constructos se contemplan como una posibilidad de selección específica de dianas intercelulares.

Para ello, al contrario que en el estado técnico anterior, en la presente invención se combinan de forma novedosa dos mecanismos ya conocidos, con lo cual se obtiene una inmunización por antígenos considerablemente mejor. Estos mecanismos consisten en ambos casos en módulos de transporte selectivo de antígenos, que en conjunto producen una respuesta inmunitaria muy eficiente. Cada uno de estos mecanismos de transporte actúa mediante un módulo definido de la molécula MAT. En este caso se trata de:

1. Transporte del antígeno desde el espacio extracelular hacia el espacio intracelular (módulo de translocación) en combinación con
2. Transporte específico del antígeno dentro de la célula a los orgánulos celulares responsables de procesar los antígenos (módulo de selección de dianas).

El resultado es: inmunización muy eficiente, solo IgG, ninguna IgE.

Esta nueva combinación de 2 mecanismos de transporte conocidos da como resultado p.ej. que se pueda inmunizar con muy bajas concentraciones de antígenos y además tiene sorprendentemente la gran ventaja de que aparece de manera predominante una respuesta inmunitaria del tipo Th1, es decir una respuesta inmunitaria en forma de anticuerpos IgG, pero no en forma de anticuerpos IgE causantes de alergias.

Descripción detallada de la presente invención

Secuencias de translocación / módulos de translocación

En el texto de la presente solicitud de patente los términos secuencia de translocación y módulo de translocación se usan equivalente y paralelamente con el mismo significado. El término módulo de translocación se ha introducido para aclarar que según la presente invención los módulos de translocación sólo son una parte de una molécula MAT. Además los módulos de translocación no representan sólo las secuencias peptídicas de translocación que se encuentran en la naturaleza, como p.ej. VIH-Tat, sino también p.ej. peptidomiméticos u otras estructuras que pueden adoptar la misma función que las secuencias peptídicas de translocación de origen natural.

Para la producción de moléculas MAT la presente invención comprende el uso de distintos módulos de translocación constituidos por al menos un módulo de translocación, al menos un módulo de selección de dianas y al menos un módulo de antígeno. Para el uso según la presente invención son adecuadas en general todas las secuencias de translocación actualmente conocidas y las que se conocerán en el futuro. En la literatura se describen numerosas secuencias de translocación adecuadas. Entre estas secuencias de translocación cabe citar secuencias virales, secuencias de homeoproteínas, secuencias de "cremalleras de leucina", secuencias ricas en arginina y lisina, así como otras secuencias proteicas diferentes que se secretan aunque falte la secuencia señalizadora de secreción, etc.

Secuencias peptídicas virales adecuadas como módulos de translocación

En el marco de la presente invención, como módulos de translocación son adecuadas entre otras las proteínas virales o secuencias parciales de proteínas virales tales como p.ej. la "proteína de activación transcripcional del VIH" (VIH-Tat). Entre las proteínas Tat adecuadas, además de la proteína Tat del virus VIH-1, también hay las proteínas Tat de otros lentivirus [9]. Se han descrito numerosos péptidos de Tat modificados como secuencias capaces de producir la translocación. Entre ellos se encuentran péptidos Tat que son sólo secuencias parciales de la proteína Tat [10], péptidos Tat que contienen mutaciones puntuales [10], péptidos Tat con el orden de secuencia invertido (inversa) [10] o péptidos Tat que contienen aminoácidos inusuales tales como p.ej. isómeros D de aminoácidos [10], etc. Por consiguiente todas estas variantes de secuencias peptídicas son adecuadas en general como módulos de translocación. Según la presente invención también sirven como módulos de translocación péptidos que provienen de otros virus, como p.ej. el VP22 (proteína del tegumento VP22 del virus 1 del herpes simple) [9]. Actualmente en el comercio también pueden obtenerse vectores de expresión que contienen una secuencia de VP22 adecuada para la translocación. Estos vectores de expresión permiten por tanto la producción de proteínas de fusión VP22 (Voyager[®]-VP22-System, Invitrogen, Breda, Holanda). Sin embargo la proteína de fusión no contiene ningún módulo de selección de dianas para emplearlo en este sistema de expresión. También hay otros virus - p.ej. el "virus 1 de la enfermedad de Marek", un virus que produce el linfoma en las gallinas - que expresan una proteína afín al VP22 igualmente adecuada como módulo de translocación [11]. Estas proteínas y secuencias parciales de estas proteínas se mencionan solo como ejemplos; actualmente se conocen muchos otros péptidos, o se conocerán en el futuro, apropiados para servir de módulos de translocación en el sentido de la presente invención.

Homeoproteínas adecuadas como módulos de translocación

Otro grupo de módulos de translocación adecuados según la presente invención son los péptidos derivados de la "proteína homeótica Antennapedia de Drosophila" (ANTp) [9]. Entre otros también son adecuados como módulo de translocación los péptidos de ANTp que contienen una secuencia invertida de ANTp [7], isómeros D de aminoácidos [7] o mutaciones puntuales en su secuencia [7]. Además cabe esperar que haya muchas otras modificaciones de secuencias de ANTp probablemente capaces de facilitar la translocación [7]. Las variantes de los péptidos de ANTp se denominan también péptidos "Transportan". Otras homeoproteínas como p.ej. Engrailed 1 (En1), Engrailed 2 (En2), Hoxa-5, Hoxc-8, Hoxb-4 y KNOTTED-1 [7] contienen igualmente secuencias utilizables como módulo de translocación según la presente invención. La KNOTTED-1 es una proteína vegetal que sin embargo también es adecuada como módulo de translocación en células animales. Estos péptidos se mencionan solo como ejemplo; se conocen muchas otras homeoproteínas [12] que contienen secuencias peptídicas posiblemente adecuadas como

módulo de translocación según la presente invención. Otras homeoproteínas no conocidas hasta la fecha pueden contener secuencias adecuadas como módulo de translocación.

Proteínas de cremallera de leucina adecuadas como módulo de translocación

Otro grupo de secuencias adecuadas como módulo de translocación según la presente invención son los péptidos que contienen un dominio de "cremallera de leucina". Como ejemplos de proteínas cuyos dominios de "cremallera de leucina" pueden utilizarse como secuencia de translocación cabe citar p.ej. cFos-(139-164) humana, cJun-(252-279) humana o el factor de transcripción GCN4-(231-252) de levadura [8]. Otras proteínas de "cremallera de leucina" ya conocidas, o que se conocerán en el futuro, son igualmente adecuadas como módulo de translocación según la presente invención.

Los péptidos ricos en arginina o lisina, adecuados como módulo de translocación, son péptidos ricos en arginina que provienen con frecuencia de proteínas fijadoras de ARN y ADN, los cuales constituyen otras secuencias peptídicas utilizables como módulos de translocación según la presente invención. Como ejemplo de tales secuencias cabe mencionar VIH-1 Rev-(34-50), proteína de la cápside del virus "flock house" [*corra*] (FHV)-(35-49), BMV Gag-(7-25), HTLV-II Rex-(4-15), CCMV Gag-(7-25), P22 N-(14-30), lambda N-(1-22), phi 21 N-(12-29) y PRP6-(129-144) de la levadura [8]. Según la presente invención también se pueden emplear péptidos de poliarginina con 4 hasta 16 [8] o incluso más de 16 restos de arginina. Además de los péptidos de poliarginina, como módulos de translocación también se pueden emplear péptidos que aparte de arginina contengan otros aminoácidos, p.ej. el péptido W/R (RRWRRWRRWRRWRR [9] o el péptido R9-Tat, en el cual los 9 restos centrales de aminoácidos del total de 11 aminoácidos de un péptido Tat han sido sustituidos por restos de arginina (GRRRRRRRRRQ) [8]. Además se ha podido demostrar que los péptidos que constan p.ej. de nueve restos de lisina también tienen la capacidad de actuar como módulo de translocación en el sentido de la presente invención [13]. Estos péptidos solo se mencionan como ejemplo; hay muchos otros péptidos ricos en arginina o lisina que son adecuados para utilizarlos como módulos de translocación según la presente invención [8, 13]. Otros péptidos ricos en arginina o lisina ya conocidos, o que se conocerán en el futuro, también son supuestamente adecuados como módulo de translocación. Las secuencias que contienen grupos guanidino o amidino también son adecuadas como módulos de translocación según la presente invención [14].

Proteínas sin secuencia señalizadora que son adecuadas como módulo de translocación

Hay otra serie de proteínas que son capaces de atravesar la membrana celular de dentro a fuera, es decir, de ser secretadas, sin que exista una secuencia señalizadora de secreción. En sentido contrario, estas proteínas también pueden penetrar a menudo en el interior de la célula desde fuera. Estas proteínas o secuencias parciales de las mismas también pueden utilizarse por consiguiente como módulos de translocación según la presente invención. Algunos ejemplos de dichas proteínas son: "factor de crecimiento de fibroblastos 1" (FGF-1), "factor de crecimiento de fibroblastos 2" (FGF-2), caveolina-1, lactoferrina, tiorredoxina, interleucina 1 beta y "factor neurotrófico ciliar" (CNTF) [7] o interleucina 1 alfa, "proteína del conducto deferente", "factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas" (PD-ECGF), timosina, para-timosina, lectina de 14,5 kDa (L14), transglutaminasa, "proteína análoga a tiorredoxina" (ADF), "actividad promotora del crecimiento del nervio ciático", factor XIIIa, "inhibidor del crecimiento derivado de mamíferos", galectina, rodanasa [15].

Estos péptidos solo se mencionan como ejemplo; se conocen muchos otros péptidos, o se conocerán en el futuro, que son adecuados como módulos de translocación según la presente invención.

Hay muchas toxinas adecuadas como módulo de translocación o secuencias parciales de toxinas que tienen la propiedad de actuar como módulo de translocación, p.ej. las siguientes toxinas: abrina completa, ricino completo, modicina completa, exotoxina A de pseudomonas completa, toxina diftérica completa, toxina de tos ferina completa, toxina Shiga completa, la cadena A de ricino, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, el dominio de actividad enzimática de la exotoxina de pseudomonas, la cadena A de la toxina diftérica, el dominio de actividad enzimática de la toxina de tos ferina, el dominio de actividad enzimática de la toxina Shiga, gelonina, proteína antiviral de fitolaca americana, saporina, tritina, toxina de cebada y péptidos de veneno de serpiente [16]. Estas toxinas citadas como ejemplo y muchas otras toxinas no mencionadas expresamente, o que se conocerán en el futuro, se pueden usar módulo de translocación según la presente invención.

Control de la eficiencia de los módulos de translocación

La eficiencia de la translocación se puede controlar variando p.ej. la longitud de una cadena de poli-arginina o p.ej. seleccionando solo una secuencia parcial del VIH-Tat, a fin de conseguir una translocación muy eficiente de la respectiva molécula MAT o una translocación menos eficiente según los correspondientes requerimientos [8,13]. Una translocación muy eficiente puede tener la ventaja de incrementar la efectividad de la molécula MAT y/o de poder reducir la dosis de molécula MAT, con lo cual se ahorran costes de vacuna. A su vez una dosis reducida de molécula MAT tiene la ventaja de producir efectos secundarios menores. Por otra parte una menor eficiencia de translocación permite que las moléculas MAT se repartan ampliamente en el sujeto tratado - p.ej. tras la inyección intravenosa - pues no penetran enseguida localmente en todas las células cercanas de forma casi cuantitativa.

Ejemplos de secuencias mínimas que funcionan como módulo de translocación

Todas las secuencias de translocación citadas como ejemplo no tienen por qué estar en forma de proteína total como componente de la molécula MAT, para poder actuar como módulo de translocación en la molécula MAT según la presente invención. Antes bien, para muchas de las proteínas citadas se conoce una parte mínima de secuencia que se puede usar como secuencia de translocación. Para el VIH-Tat, p.ej., esta secuencia parcial es la siguiente: Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg, para la VP22 es: Asp-Ala-Ala-Thr-Ala-Thr-Arg-Gly-Arg-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-Pro-Thr-Glu-Arg-Pro-Arg-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Arg-Pro-Arg-Arg-Pro-Val-Glu y para Antennapedia es: Arg-Gln-Iso-Lys-Iso-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys [17]. Además las secuencias también se pueden usar en forma de fragmentos que no corresponden a los tramos de secuencia mínimamente funcionales actualmente conocidos, siempre que la secuencia resultante aún tenga funcionalidad como módulo de translocación.

Por tanto los módulos de translocación no tienen por qué estar en forma de proteína total o de molécula total como componente de la molécula MAT, para poder actuar como módulo de translocación en la molécula MAT según la presente invención. Antes bien, para algunas de las proteínas mencionadas se conoce p.ej. una parte de secuencia que puede utilizarse como módulo de translocación. Además las secuencias proteicas también se pueden usar en forma de fragmentos que no corresponden a los tramos de secuencia funcionales conocidos hasta la fecha, siempre que la secuencia resultante aún tenga funcionalidad como módulo de translocación. La funcionalidad de un módulo de translocación se puede determinar usando p.ej. módulos de translocación con marcación fluorescente o módulos de translocación marcados con enzimas o con partículas metálicas. Los módulos de translocación así marcados se dosifican a un animal de experimentación o a células cultivadas in vitro y se hace el seguimiento de la permanencia de los módulos de translocación con métodos tales como FACS ("fluorescence activated cell sorting" [*clasificación de células activadas por fluorescencia*]), microscopia, microscopia de fluorescencia confocal, microscopia electrónica etc. Estas técnicas de comprobación de la funcionalidad de los módulos de translocación están descritas en la literatura y en parte ya han sido utilizadas para determinar la funcionalidad de las secuencias para la translocación [8, 18].

Secuencias de selección de dianas / módulos de selección de diana

En el texto de la presente solicitud de patente los términos secuencia de selección de dianas y módulo de selección de diana se usan indistintamente de manera equivalente y con igual significado. En esta solicitud de patente se entiende por selección de dianas siempre la de tipo intracelular. El término módulo de selección de diana se ha introducido para aclarar que los módulos de translocación son sólo una parte de una molécula MAT en el sentido de la presente invención.

La presente comprende el uso de diferentes secuencias como módulos de selección de diana para la producción de moléculas MAT constituidas por al menos un módulo de translocación, al menos un módulo de selección de dianas y al menos un módulo de antígeno. Para su uso como módulos de selección de diana según la presente invención son adecuadas en general todas las secuencias de aminoácidos y moléculas actualmente conocidas - y las que se conocerán en un futuro - capaces de facilitar la selección de dianas. En la literatura se describen numerosas secuencias adecuadas, entre ellas todas las secuencias que producen el transporte intracelular de la molécula MAT hacia los sitios u orgánulos del interior de una célula, en los cuales tienen lugar los procesos que intervienen en la presentación de los módulos de antígeno contenidos en la molécula MAT. A estos sitios y orgánulos del interior de la célula pertenecen especialmente los "compartimentos de MHC de clase II" (MIIC), endosomas, lisosomas, el aparato de Golgi, la red trans-Golgi y el retículo endoplásmico. Estos orgánulos intracelulares participan en procesos tales como p.ej. el transporte o el procesamiento de antígenos, la preparación y la carga de las moléculas MHC II con antígenos o con antígenos procesados y el transporte de las moléculas MHC II cargadas con antígenos hacia la superficie celular, etc.

Moléculas MHC que contienen secuencias adecuadas como módulo de selección de dianas

Según la presente invención hay una serie de secuencias adecuadas como módulos de selección de dianas. La cadena invariante de la molécula MHC II (li, cadena invariante, cadena gamma de MHC II) es la secuencia descrita con mayor frecuencia en la literatura, capaz de mediar en la selección de dianas. En el ser humano se describen diferentes variantes de la cadena invariante, también denominadas liP33, liP41, liP35 y liP43 [1], que son adecuadas como módulos de selección de dianas. Otras secuencias adecuadas como módulo de selección de dianas según la presente invención son las cadenas beta de la molécula MHC II [19]. Asimismo son adecuados como módulo de selección de dianas fragmentos de las secuencias mencionadas.

Proteínas de membrana lisosomales que contienen secuencias adecuadas como módulo de selección de dianas

Una serie de proteínas de membrana existentes en los lisosomas, de los cuales constituyen uno de los principales componentes proteicos, presentan motivos secuenciales que producen una dirección selectiva hacia el lisosoma. A este grupo de proteínas pertenecen entre otras Lamp 1 ("proteína de membrana asociada a lisosoma-1"), Lamp 2, Lamp 3, Limp II ("proteína de membrana integrada en el lisosoma II") y LAP ("fosfatasa ácida lisosomal") [4]. Estas

proteínas lisosomales y otras actualmente conocidas - o que se conocerán en un futuro - que presentan motivos secuenciales de selección de dianas se pueden utilizar como módulos de selección de dianas en el sentido de la presente invención, pudiendo emplear como módulo de selección de dianas toda la secuencia proteica o secuencias parciales.

5 Proteínas Tetraspan que contienen secuencias adecuadas como módulo de selección de dianas

Los miembros de una familia de proteínas que poseen cuatro dominios transmembranales (“proteínas tetraspan”) también son adecuados como módulos de selección de dianas en el sentido de la presente invención, ya que estas proteínas llegan muy eficientemente a los MIIC. El mecanismo por el cual las proteínas “Tetraspan” llegan a los MIIC no está claro, pues no contienen ninguna secuencia conocida de aminoácidos que facilite una selección de dianas. A pesar de ello hay mecanismos que transportan estas proteínas a los MIIC, es decir, que se pueden emplear como módulos de selección de dianas según la presente invención. Entre las proteínas de la familia “Tetraspan” cabe citar CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 y CD86 [20]. De la CD63 y de la CD82 es sabido que se asocian con moléculas MHC II, HLA-DO y HLA-DM [20]. Las proteínas “Tetraspan” también existen en las membranas de los exosomas. Los exosomas son vesículas que se forman tras la fusión de los MIIC con la membrana plasmática y así se liberan de la célula que presenta el antígeno. Los exosomas contienen moléculas MHC II y pueden presentar antígenos, estimulando así las células T [20]. Otras proteínas muy similares a la familia de las proteínas “Tetraspan”, que por tanto también son adecuadas como módulo de selección de dianas según la presente invención, son la proteína de membrana Schistosoma mansoni SM23 y el antígeno asociado a tumores CO-029 [21]. Otras proteínas Tetraspan no nombradas explícitamente o aún desconocidas o secuencias parciales de proteínas Tetraspan también pueden contener secuencias adecuadas como módulos de selección de dianas. En el compartimento endosomal/ lisosomal de diversos tipos de células se pueden hallar muchas otras proteínas que son adecuadas como módulos de selección de dianas y que por tanto llegan ahí mediante ciertos mecanismos que hasta ahora solo se conocen en parte. Por consiguiente estas proteínas o secuencias parciales de las mismas también se pueden emplear como módulos de selección de dianas según la presente invención. Entre estas proteínas existentes en el compartimento endosomal/lisosomal cabe mencionar la lipoproteína de baja densidad (LDL), la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la inmunoglobulina polimérica, la transferrina, el receptor de manosa-6-fosfato dependiente de cationes, la CD3, etc. [21], así como la CD1b [22] y muchas otras proteínas o secuencias proteicas actualmente conocidas, o que se conocerán en el futuro, que permiten el direccionamiento hacia el compartimento endosomal/ lisosomal. Estas secuencias se pueden usar como módulo de selección de dianas según la presente invención. Varias compañías comerciales ofrecen vectores de expresión que llevan secuencias de ácido nucleico codificadoras de secuencias adecuadas para seleccionar dianas. Por ejemplo, las firmas BD Bioscience Clontech (Palo Alto, CA, USA) y Stratagene (La Jolla, CA, USA) ofrecen vectores de expresión con módulos de selección de dianas que dirigen la proteína de fusión resultante hacia el aparato de Golgi o los peroxisomas. Sin embargo estos vectores de expresión no permiten obtener proteínas de fusión que contengan un módulo de translocación, por lo cual difieren de las moléculas MAT de la presente invención. A tal fin, en los vectores de Clontech se usa p.ej. una secuencia de calreticulina (KDEL “secuencia de recuperación”) para dirigir la proteína de fusión hacia el aparato de Golgi. Otras proteínas no nombradas explícitamente o aún desconocidas también pueden contener secuencias adecuadas como módulos de selección de dianas en el sentido de la presente invención.

Motivos secuenciales existentes en determinados grupos de secuencias de selección de dianas

En distintas secuencias proteicas se determinaron ciertos motivos secuenciales que son importantes para su función como módulo de selección de dianas. En la cadena beta del HLA-DM p.ej. se identificó como selector de dianas el motivo secuencial tirosina-treonina-prolina-leucina, en el cual los restos de tirosina y leucina parecen tener especial importancia funcional [2]. En distintas proteínas de membrana lisosomales como LAP (“fosfatasa ácida lisosomal”), Lamp 1 (“proteína de membrana asociada a lisosoma-1”), Lamp 2 y Lamp 3 [3, 4] y en la CD 1 b [22] se identificaron motivos de tirosina importantes para la selección intracelular de dianas. En otra proteína lisosomal, Limp II (“proteína de membrana integrada en el lisosoma II”), se pudo identificar un motivo de leucina importante para la selección intracelular de dianas [4]. En li pudo demostrarse que hay dos partes de secuencia independientes entre sí que son importantes para la selección intracelular de dianas (posición de aminoácidos 1 hasta 11 y 12 hasta 29) [23]. Ambas secuencias de selección de dianas son de por sí funcionales y la secuencia 1 hasta 11 contiene en la posición 7 y 8 un motivo de leucina-isoleucina funcionalmente esencial [23]. La cadena beta de la molécula MHC II lleva también un motivo secuencial que contiene uno o dos restos de leucina funcionalmente importantes e inmediatamente antes de este motivo de leucina hay en el extremo N-terminal un resto conservado de glicina [19]. Por tanto, en resumen, los restos de leucina y tirosina especialmente tienen una función importante en las secuencias de selección de dianas y por consiguiente se pueden diseñar exclusivamente secuencias de aminoácidos correspondientes como módulos de selección de dianas utilizables en el sentido de la presente invención.

60 “Estructuras no aminoácidas” utilizables como módulos de selección de dianas

Según la presente invención, como módulos de selección de dianas en moléculas MAT también se pueden utilizar moléculas no correspondientes a una secuencia de aminoácidos o a un aminoácido. Un ejemplo conocido desde hace tiempo de una estructura adecuada para el direccionamiento a los lisosomas es la manosa-6-fosfato [24]. Las proteínas que contienen restos de manosa-6-fosfato son transportadas por diversos receptores de manosa-6-fosfato

hacia los lisosomas. Este mecanismo puede aprovecharse según la presente invención para transportar la molécula MAT a los lisosomas, con el fin de conseguir una presentación eficiente del antígeno. Para ello se pueden acoplar a la molécula MAT restos de manosa-6-fosfato - solos o formando parte de estructuras sacáridas más complejas - mediante enlaces covalentes o no covalentes. En general todos los ligandos de los receptores de manosa-6-fosfato se pueden emplear según la presente invención como módulos de selección de dianas en moléculas MAT. Otras estructuras no conocidas actualmente, o que se conocerán en el futuro, que permitan el direccionamiento hacia los MIIC, los endosomas, lisosomas, el aparato de Golgi, la red trans-Golgi o el retículo endoplásmico se pueden usar como módulo de selección de dianas en el sentido de la presente invención.

Todos los módulos de selección de dianas citados como ejemplo no tienen por qué estar en forma de proteína total o de molécula total como componente de la molécula MAT, para poder actuar como módulo de selección de dianas en la molécula MAT según la presente invención. Antes bien, para algunas de las proteínas mencionadas se conoce p.ej. una parte de secuencia que puede utilizarse como módulo de selección de dianas. Además las secuencias proteicas también se pueden emplear en forma de fragmentos que no corresponden a los tramos de secuencia funcionales conocidos hasta la fecha, siempre que la secuencia resultante aún tenga funcionalidad como módulo de selección de dianas. La funcionalidad de un módulo de selección de dianas se puede determinar utilizando p.ej. módulos de selección de dianas con marcación fluorescente o módulos de selección de dianas marcados con enzimas o con partículas metálicas. Los módulos de selección de dianas así marcados se dosifican a un animal de experimentación o a células cultivadas in vitro y se hace el seguimiento de la permanencia de los módulos de selección de dianas con métodos tales como FACS ("fluorescence activated cell sorting" [*clasificación de células activadas por fluorescencia*]), microscopia, microscopia de fluorescencia confocal, microscopia electrónica etc.

Módulos de antígeno

En principio como módulos de antígeno pueden utilizarse básicamente todos los tipos de antígenos que pueden modular una respuesta inmunitaria. Son adecuados tanto los antígenos conocidos actualmente, como los antígenos que se descubrirán en un futuro. En ciertas circunstancias también puede tratarse de antígenos que no produzcan una respuesta inmunitaria del sujeto al aplicar los métodos de inmunización convencionales actualmente conocidos en el estado técnico, pero sí al usar los nuevos procedimientos descritos en la presente solicitud de patente. Como antígenos según la presente invención se pueden emplear no sólo proteínas y péptidos, sino también estructuras sacáridas, lípidos, p.ej. lipopolisacáridos, ácidos lipoteicoicos y otros componentes de membranas bacterianas (la CD1b se une p.ej. a estructuras sacáridas y lípidos), ácido nucleicos como p.ej. ADN que contiene motivos CpG, sustancias orgánicas como p.ej. látex, o sustancias farmacéuticamente activas. El antígeno puede provenir de seres humanos, animales, plantas, hongos, parásitos, microorganismos uni o pluricelulares, virus y otras formas de vida. Los antígenos se pueden haber aislado de material biológico o se pueden haber producido de forma recombinante o sintéticamente, p.ej. mediante síntesis peptídica. En el caso de antígenos producidos sintéticamente puede tratarse de sustancias de origen natural o no existentes en la naturaleza, pero que pueden obtenerse por síntesis química. Ejemplos de sustancias no existentes en la naturaleza pero que pueden servir de antígenos son p.ej. sustancias producidas sintéticamente que hay en los medicamentos o péptidos sintéticos con secuencias de aminoácidos no existentes en la naturaleza o peptidomiméticos, etc. Los antígenos de origen natural, producidos sintéticamente o de forma recombinante se pueden modificar por métodos de biología molecular, enzimáticos, químicos otros, a fin de conferirles propiedades más ventajosas para la aplicación respectiva. Estas propiedades ventajosas pueden ser, entre otras, una efectividad antigénica mayor o menor, un efecto antigénico más amplio, una mejor solubilidad en disolventes hidrófilos o hidrófobos, una mayor permeabilidad de los módulos de antígeno a través de las membranas celulares, de las membranas de los orgánulos, de la barrera hematoencefálica, de la barrera de fluido hematocefalorraquídeo, etc., un tiempo de vida medio superior o inferior in vivo o in vitro, una menor o mayor toxicidad, una mejor trazabilidad del antígeno in vivo o in vitro tras su aplicación en forma de una molécula MAT, etc. Además según la presente invención se pueden combinar varios antígenos en un módulo de antígeno [25]. Para ello el módulo de antígeno puede contener antígenos idénticos en copia múltiple o p.ej. se pueden combinar en un módulo de antígeno diferentes variantes del mismo antígeno. Un módulo de antígeno también puede llevar una combinación de antígenos, p.ej. de antígeno 1 y otros antígenos, p.ej. de antígeno 2, etc. Un módulo de antígeno también puede contener otro tipo de combinaciones, como p.ej. antígeno 1 en copia múltiple y antígeno 2 en copia simple, etc. en una molécula MAT puede haber asimismo uno o más módulos de antígeno distintos y/o idénticos. En principio son posibles todas las combinaciones de copias existentes de antígenos, simples o múltiples, idénticas o modificadas, derivadas de uno o varios antígenos diferentes según la presente invención.

Antígenos y alérgenos utilizables como módulo de antígeno

Hasta la fecha se han descrito en la literatura numerosos antígenos, sobre todo alérgenos. Los siguientes alérgenos, conocidos en concreto, se pueden usar como módulo de antígeno según la presente invención. En el estado técnico se conocen otros alérgenos y variantes de alérgenos, que también pueden utilizarse como módulo de antígeno según la presente invención [26, 27].

Los alérgenos se clasifican en grupos tales como los alérgenos de hierbas y gramíneas, de árboles, de ácaros, de hongos, de insectos, de alimentos y otros alérgenos como p.ej. los del látex. En los listados se enumeran del modo

siguiente: nombre científico del organismo, una abreviatura usual del alérgeno seguida directamente del número de acceso del banco genético del alérgeno (escrito entre paréntesis), siempre que sea conocido.

Alérgenos de hierbas y gramíneas:

5
10
Ambrosia artemisiifolia, Amb a 1 y Amb a 2; Mercurialis annua, Mer a 1 (Y13271); Parietaria judaica, Par j 1 (X77414), Par j 2 (X95865; X95866); Cynodon dactylon, Cyn d 1 (S83343); Dactylis glomerata, Dac g 3 (U25343); Holcus lanatus, Hol l 1 (Z27084, Z68893); Lolium perenne, Lol p 1 (M57474), Lol p 2 (X73363) Lol p 5 (M59163); Phalaris aquatica, Pha a 1 (S80654); Phleum pratense, Phl p 1 (X78813), Phl p 2 (X75925), Phl p 3, Phl p 5 (X74735)

Alérgenos de árboles:

15
20
Alnus glutinosa, Aln g 1 (S50892); Betula verrucosa, Bet v 1 (X15877), Bet v 2, Bet v 1 d; Carpinus betulus, Car b 1 (X66932, X66918); Corylus avellana, Cor a 1 (X70999, X71000, X70997, X70998, Z72439, Z72440, AF136945, AF323973, AF323974, AF323975); Ligustrum vulgare, Lig v 1 (X77787, X77788); Olea europea, Ole e 1 (S75766), Ole e 9 (AF249675); Syringa vulgaris, Syr v 1 (X76541); Cryptomeria japonica, Cry j 1, Cry j 2 (D29772, D37765); Cupressus arizonica, Cup a 1 (AJ278498); Cupressus sempervirens, Cup s 1 (AF257491); Juniperus ashei, Jun a 2 (AJ404653)

Alérgenos de ácaros:

25
Blomia tropicalis, Blo t 5 (U59102); Dermatophagoides farinae, Der f 1, Der f 2, Der f 11; Dermatophagoides pteronyssinus, Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7; Lepidoglyphus destructor, Lep d 2 (X81399); P. americana, Cra-A; T. putrescentiae, Tyr p2

Alérgenos de animales:

30
Bos domesticus, Bos d 2 (L42867); Equus caballus, Equ c 1 (U70823); Felis domesticus, Fel d 1 (M74952, M74953)

Alérgenos de hongos:

35
40
Alternaria alternata, Alt a 1 (U82633), Alt a 2 (U62442); Aspergillus flavus, Asp fl 1 (AF137272); Aspergillus fumigatus, Asp f 1 (M83781, S39330), Asp fl/a, Asp f 2 (U56938), Asp f 3 (U20722, U58050), Asp f 4, Asp f 6, Asp f 8; Aspergillus niger, Asp n 18; Aspergillus oryzae, Asp o 13 (X17561); C. comatus, Cop c 1; Penicillium chrysogenum, Pen ch 13 (AF193420), Pen ch 20 (S77837); Penicillium oxalicum, Pen o 18 (AAG44478); Malassezia sympodialis, Mal s 1 (X96486)

Alérgenos de insectos:

45
Apis mellifera, Api m 1 (X16709), Api m 2 (L10710), Api m 4 (X02007); Blattella germanica, Bla g 1 (AF072219, L47595, AF072221, AF072220), Bla g 2 (U28863), Bla g 4 (U40767), Bla g 5 (U92412); Periplaneta americana, Per a 1 (AF072222), Per a 3 (L40819); Dolichovespula maculata, Dol m 1 (X66869), Dol m 2 (L34548) Dol m5 (J03601); Dolichovespula arenaria, Dol a 5 (M98859), Polistes annularis, Pol a 5 (M98857); Vespula vulgaris, Ves v 1 (L43561), Ves v 2 (L43562), Ves v 5 (M98858); Myrmecia pilosula, Myr p 1 (X70256), Myr p 2 (S81785)

Alérgenos de alimentos:

50
55
Salmo salar, Sal s 1 (X97824); Bos domesticus, Bos d 4 (M18780), Bos d 5 (X14712); Gallus domesticus, Gald 1 (J00902), Gal d 2 (J00992); Metapenaeus ensis, Met s 1 (U08008); Hordeum vulgare, Hor v 15 (X63517); Oryza sativa, Ory s 1 (U31771); Apium graveolens, Api g 1 (Z48967); Daucus carota, Dau c 1 (U47087, D88388); Malus domestica, Mal d 1 (X83672); Pyrus communis, Pyr c 1 (AF057030); Persea americana, Pers a 1 (Z78202); Prunus armeniaca, Pru ar 1 (U93165); Prunus avium, Pru av 1 (U66076); Arachis hypogaea, Ara h 1 (L34402), Ara h 2 (L77197); Bertholletia excelsa, Ber e 1 (M17146); Juglans regia, Jug r 1 (U66866), Jug r 2 (AF066055); Ricinus communis, Ric c 1 (X54158); Sesamum indicum, Ses i 1 (AF240005)

Otros alérgenos (látex):

60
Hevea brasiliensis, Hev b 1 (X56535), Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5 (U42640), Hev b 6 (M36986), Hev b 7, Hev b 8

Estos alérgenos conocidos solo se citan como ejemplo; del estado técnico se conocen otros alérgenos que también pueden usarse en módulos de antígeno según la presente invención.

65
Aparte de los alérgenos se conoce una serie de agentes patógenos contra los que actualmente aún no se dispone de ninguna inmunización eficaz o duradera. Como el procedimiento de la presente invención se basa en una nueva

estrategia de inmunización, es posible que sea efectivo para inmunizar contra estas enfermedades que hasta ahora no han podido tratarse profilácticamente de modo satisfactorio mediante inmunizaciones. Entre tales enfermedades cabe mencionar especialmente las infecciones por virus VIH, por virus de la hepatitis C, por agentes patógenos de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), la lepra (*Mycobacterium leprae*), la peste (*Yersinia pestis*), así como las causadas por agentes patógenos de la malaria (especies *Plasmodium*, p.ej. *falciparum*).

Otros módulos que pueden existir en las moléculas MAT

Además de los tres módulos ya descritos - el módulo de translocación, el módulo de selección de dianas y el módulo de antígeno - de que debe constar al menos la molécula MAT, puede haber en ella otros módulos opcionales. Entre ellos cabe señalar p.ej. módulos que permiten el aislamiento o la identificación de las moléculas MAT. En el estado técnico estos módulos también se denominan frecuentemente "etiquetas" y por tanto en esta solicitud de patente se designan a continuación como módulos de etiqueta. Otros módulos opcionalmente contenidos en las moléculas MAT pueden ser espaciadores, es decir, módulos situados entre los demás con el fin de acoplarlos entre sí. En esta solicitud de patente tales módulos designan en lo sucesivo como módulos espaciadores. También es posible que ciertos módulos adopten simultáneamente la función de dos o más módulos. Por ejemplo, muchos módulos de etiqueta se pueden usar simultáneamente para aislar y detectar la molécula MAT; también cabría la posibilidad de usar un módulo de antígeno contenido en una molécula MAT para detectar y/o aislar la molécula MAT cuando p.ej. se dispone un anticuerpo contra el módulo de antígeno etc.

Módulos de etiqueta que puede haber en las moléculas MAT

Según la presente invención uno o más módulos de etiqueta distintos y/o idénticos pueden ser componentes de una molécula MAT. Los módulos de etiqueta pueden ser péptidos cortos, con frecuencia de no más de 20 restos de aminoácidos, pero también pueden corresponder a secuencias de proteínas completas o a determinados dominios de proteínas. Los módulos de etiqueta también pueden ser grupos funcionales no formados por aminoácidos, como p.ej. biotina o digoxigenina. Casi todos los módulos de etiqueta se pueden usar de dos modos distintos. Por un lado para aislar la molécula MAT y por otro lado para detectar su presencia. En general todos los módulos de etiqueta conocidos hasta la fecha y los que se conocerán en un futuro son adecuados para el empleo según la presente invención. Como ejemplos de moléculas de etiqueta apropiadas para usar según la presente invención cabe citar: secuencias de histidina constituidas por 4 hasta 12 o más restos de histidina preferiblemente consecutivos, también denominadas His-tag, His6-tag, HIS6-tag, Penta-His[®], Tetra-His[®], RGS-His[®], etc. (Qiagen, Hilden, Alemania), Myc o c-Myc-tag, PinPoint[®]-tag (una secuencia señalizadora que dota con un grupo de biotina la correspondiente proteína de bacterias in vivo), HA-tag, 6xHN-tag (Promega Biosciences Inc., San Louis Obispo, CA, USA), Xpress[®]-tag, myc-tag, V5-tag (Invitrogen, Breda, Holanda), S-tag, CBD-tag, GST-tag, HSV-tag, T7-tag (Novagen Inc., Madison, WI, USA), FLAG-tag, HA-tag, c-myc-tag, "etiqueta de péptido fijador de calmodulina" (CBP) (Stratagene, La Jolla, CA, USA), His6-tag, etiqueta de proteína A, etiqueta de glutatión S-transferasa (GST) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), Strep-tagII (IBA GmbH, Göttingen, Alemania), His-tag (Roche Applied Science, Rotkreuz, Suiza), FLAG-tag, GST-tag, etiqueta de proteína A, (Sigma, St. Louis, MO, USA), "proteína fijadora de maltosa" (MBP), etiqueta fijadora de quitina" (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), His-tag (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA). Para algunos de estos módulos de etiqueta también se describen aplicaciones que implican el uso de más de un módulo de etiqueta en una molécula. Por ejemplo, puede haber dos módulos de etiqueta acoplados al extremo N- o C-terminal de una proteína o bien se puede acoplar un módulo de etiqueta al extremo N-terminal y otro al extremo C-terminal (Qiagen, Hilden, Alemania y Stratagene, La Jolla, CA, USA). Los módulos de etiqueta también pueden insertarse dentro de la secuencia de otras proteínas, p.ej. entre dos dominios de una proteína (Strep-tagII, IBA, Göttingen, Alemania).

Otros módulos de etiqueta se usan en primer lugar para la detección de la molécula a la cual están acoplados. No obstante estas moléculas de etiqueta también se usan en principio para el aislamiento de proteínas, p.ej. mediante el empleo de cromatografía de afinidad. Para ello pueden usarse p.ej. materiales cromatográficos que llevan acoplados anticuerpos contra estos módulos de etiqueta. Según la presente invención también se pueden usar módulos de etiqueta tales como p.ej. la "proteína fluorescente verde" (GFP), la "proteína fluorescente verde mejorada" (EGFP), la "proteína fluorescente cian mejorada" (ECFP), la "proteína fluorescente amarilla mejorada" (EYFP), la "proteína fluorescente roja" (DsRed2) (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, CA, USA), la "proteína fluorescente verde de renilla" (hrGFP) (Stratagene, La Jolla, CA, USA), etc. Estos módulos de etiqueta pueden encontrarse tanto en el extremo N- como C-terminal, p.ej. de una proteína de fusión. Aparte de los módulos de etiquetas fluorescentes también pueden usarse también enzimas como módulo de etiqueta. Los enzimas empleados con frecuencia son p.ej. luciferasa, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, etc. Estos enzimas se pueden detectar mediante su respectiva actividad enzimática, es decir, a través de la reacción de los sustratos de estos enzimas. Para ello son adecuados distintos tipos de sustrato, p.ej. sustratos que absorben luz en la región visible del espectro, sustratos fluorescentes cuya reacción produce emisión de luz, o sustratos cuya reacción enzimática se puede determinar por la disminución de la concentración del sustrato o por el aumento del producto, empleando diversos métodos de detección, etc.

Otro posible uso de los módulos de etiqueta según la presente invención es el empleo de p.ej. secuencias peptídicas adecuadas como sustratos de cinasas. Estas secuencias peptídicas se pueden marcar añadiendo fósforo radiactivo

y cinasas. Como ejemplos de módulos de etiqueta utilizables en el sentido de la presente invención cabe mencionar: la "etiqueta kemptide" (un péptido que puede ser fosforilado por la proteína cinasa A), la "etiqueta de péptido fijador de calmodulina" (CBP), que también puede ser fosforilado con proteína cinasa A (Stratagene, La Jolla, CA, USA), etc.

5 Otro posible uso de los módulos de etiqueta según la presente invención es el empleo de p.ej. proteínas, dominios de proteína o secuencias peptídicas que fijan específicamente otras proteínas u otras estructuras. De la literatura se conocen ejemplos de tales módulos de etiqueta: proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L, todas las cuales se unen a estructuras de anticuerpos (Pierce, Rockford, IL, USA); glutatión-S-transferasa, que se une a glutatión; la "proteína fijadora de maltosa" (MBP), que se une a amilosa; estreptavidina o avidina, que se unen a biotina; el "péptido fijador de calmodulina", que se une a calmodulina; la "etiqueta fijadora de quitina", que se une a quitina, etc. En general pueden usarse como módulo de etiqueta según la presente invención los tipos de moléculas que se unen respectivamente de manera específica a otras moléculas, es decir receptor-ligando, anticuerpo-antígeno, lectina-estructura sacárida, proteína-lípido, proteína-ácido nucleico, proteína-proteína, etc., y muchos otros ejemplos que están descritos en la literatura [28].

Módulos espaciadores

20 Como módulos espaciadores en el sentido de la invención se pueden usar todos los tipos de moléculas adecuadas para acoplar entre sí otros módulos componentes de la molécula MAT. El acoplamiento puede tener lugar mediante enlaces covalentes o no covalentes. Los módulos espaciadores sirven entre otras cosas para distanciar entre sí los diferentes módulos de la molécula MAT, con el fin de que no se interfieran recíprocamente en su funcionalidad. El acoplamiento de los módulos de la molécula MAT según la presente invención puede tener lugar mediante módulos espaciadores que posteriormente pueden disociarse por reacciones enzimáticas o químicas, por ejemplo mediante proteasas.

De este modo, si es necesario, los módulos de la molécula MAT unidos mediante los módulos espaciadores pueden separarse de nuevo.

30 Para ello pueden usarse en general todas las proteasas conocidas actualmente o las que se conocerán en un futuro [29,30]. Las proteasas usadas actualmente con frecuencia son la trombina, el factor Xa, la enterocinasa o el sistema TAGZyme (Qiagen, Hilden, Alemania), etc. Las diferentes reacciones químicas adecuadas para separar los módulos espaciadores son conocidas del especialista o se pueden deducir de las indicaciones del fabricante de moléculas espaciadoras, p.ej. de la firma Pierce.

35 Los módulos espaciadores pueden ser concretamente secuencias peptídicas o moléculas orgánicas. En el estado técnico se conocen numerosas moléculas espaciadoras que se pueden usar en el sentido de la presente invención. Según la misma también pueden emplearse moléculas espaciadoras que se desarrollen o descubran en el futuro. Como módulos espaciadores son adecuados entre otros los de tipo peptídico, los reticulantes, polímeros naturales o sintéticos como p.ej. los ácidos nucleicos, hidrocarburos sustituidos o no sustituidos, etc. También pueden usarse como módulos espaciadores combinaciones de moléculas capaces de formar complejos mediante interacciones no covalentes entre sí, uniendo de este modo dos o más módulos en una molécula MAT. Un ejemplo conocido de tal combinación de moléculas unidas entre sí es el compuesto biotina / estreptavidina.

45 Secuencias peptídicas como módulos espaciadores

Muchas proteínas que constan de varios dominios tienen en su secuencia de aminoácidos unas zonas cortas que en la literatura también se denominan espaciadores. Estos espaciadores sirven para distanciar entre sí los distintos dominios de la proteína, con el fin de que no se interfieran recíprocamente en su funcionalidad. Para ello debe garantizarse sobre todo que la secuencia espaciadora sea flexible, de manera que ambos dominios no se impidan estéricamente en su función.

55 Las secuencias peptídicas de este tipo pueden usarse según la presente invención como módulos espaciadores. En la literatura se describe un gran número de secuencias peptídicas espaciadoras. Preferiblemente estos espaciadores tienen una longitud comprendida entre 2 y 60 aminoácidos, pero también pueden presentar secuencias más largas. Los espaciadores pueden constar de un solo aminoácido. Muchos vectores de expresión disponibles en el comercio ya comprenden zonas de la secuencia codificadoras de espaciadores peptídicos que p.ej. unen una secuencia de etiqueta con la secuencia proteica que debe insertarse en el vector de expresión. A menudo se usan espaciadores muy cortos, que solo constan de dos aminoácidos como p.ej. leucina-glicina, glicina-alanina o serina-alanina (IBA GmbH, Göttingen, Alemania), o secuencias cortas de 4 hasta 6 aminoácidos de longitud, que constan de glicina y/o alanina (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA). En la literatura se describen muchas otras secuencias espaciadoras que pueden usarse como módulos espaciadores según la presente invención. En principio se pueden utilizar como módulo espaciador en las moléculas MAT de la presente invención todas las moléculas espaciadoras conocidas actualmente y las que se conocerán en el futuro. Un método para identificar secuencias de aminoácidos adecuadas como módulos espaciadores es el empleo de bancos de datos que examinan las secuencias de aminoácidos por dominios proteicos. Las secuencias de aminoácidos cortas, de preferiblemente 2 hasta 60 aminoácidos de longitud,

presentes en una secuencia de aminoácidos entre dos dominios proteicos así identificados se pueden usar como módulo espaciador en el sentido de la presente invención. Uno de los bancos de datos actualmente disponibles para la identificación de dominios proteicos, y por lo tanto también de secuencias peptídicas adecuadas como módulo espaciador, es la biblioteca de dominios proteicos SBASE (“SBASE protein domain library”) [31].

5

Agentes de reticulación como módulos espaciadores

Según la presente invención, en la molécula MAT también se pueden insertar módulos espaciadores en forma de reticulantes. Para ello se preparan los módulos individuales de la molécula MAT y posteriormente se acoplan entre sí por enlaces covalentes mediante reacciones químicas con reticulantes. Hay muchos reticulantes disponibles en el comercio. Por ejemplo, la firma Pierce (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) vende muchos reticulantes distintos. Actualmente, de Pierce p.ej., se puede optar entre reticulantes que reaccionan con grupos amino, grupos sulfhidrilo, estructuras sacáridas, grupos carboxilo, grupos hidroxilo o de manera no selectiva con los módulos que deben combinarse en una molécula MAT. Además, para la producción de moléculas MAT, se dispone actualmente de agentes de reticulación - p.ej. de la firma Pierce Biotechnology Inc. - que pueden separarse de nuevo mediante ciertas reacciones químicas, p.ej. mediante tioles, bases, peryodato, hidroxilamina, por acción de la luz o mediante reacciones inespecíficas. Asimismo, la distancia entre los módulos individuales de la molécula MAT se puede fijar de manera controlada eligiendo adecuadamente los reticulantes. Actualmente la firma Pierce p.ej. vende agentes de reticulación que intercalan separaciones de 1,4 angstroms (yodoacetato de N-succinimidilo) hasta 34,7 angstroms (disulfuro de bis-(beta-(4-azidosalicilamido)etilo), según qué reticulante se utilice. Como posibilidad adicional de variación, en caso de usar agentes de reticulación para el acoplamiento de distintos módulos en las moléculas MAT según la presente invención se puede emplear el reticulante Sulfo-SBED de la firma Pierce Biotechnology Inc. El Sulfo-SBED acopla dos módulos en uno por enlace covalente y además contiene un grupo de biotina en la molécula espaciadora insertada. A este grupo de biotina puede añadirse luego otro módulo de la molécula MAT mediante enlaces no covalentes. Para ello el módulo que debe insertarse se puede acoplar p.ej. con avidina o estreptavidina. Entonces el módulo resultante acoplado con estreptavidina se puede acoplar a los otros módulos mediante el grupo de biotina existente en el reticulante. Según la presente invención, para unir los módulos de una molécula MAT se pueden usar en principio todos los reticulantes conocidos actualmente, así como los que se conocerán en el futuro.

30 Otros módulos espaciadores

Los módulos espaciadores en el sentido de la presente invención pueden ser p.ej. isómeros L o D de aminoácidos, aminoácidos inusuales, aminoácidos con modificaciones postraduccionales, ácidos nucleicos, PNA (“Peptide Nucleic Acids”, ácidos nucleicos peptídicos), lípidos, estructuras sacáridas, u otros polímeros naturales o sintéticos como p.ej. hidrocarburos sustituidos o no sustituidos, poliacetato, polietilenglicol, ciclodextrina, polimetacrilato, gelatina, oligourea etc., u otras sustancias o combinaciones de dichas u otras sustancias. Según la presente invención pueden usarse en principio todas las sustancias actualmente conocidas que son apropiadas para agregar módulos a una molécula MAT, así como las moléculas que se conozcan en el futuro y tengan propiedades adecuadas como módulo espaciador para la unión de módulos en una molécula MAT.

40

Módulos espaciadores que se unen entre sí por interacciones no covalentes

De esta clase de moléculas espaciadoras hay un gran número de ejemplos en la literatura. Como ejemplos de estas combinaciones de moléculas que se unen entre sí por interacciones no covalentes y que pueden encontrarse en el comercio cabe citar: biotina / estreptavidina o avidina o Strep-tagII (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) o PinPoint®-tag (Stratagene, La Jolla, CA, USA), glutatión S-transferasa / glutatión y proteína A / proporción de anticuerpos constante (FC-Teil) (Pharmacia Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia, Sigma, St. Louis, MO, USA), proteína fijadora de maltosa (MBP) / amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), histidina-tag / quelato de Ni (Qiagen, Hilden, Alemania, BD Bioscience Clontech, Palo Alto, Ca, USA, Invitrogen, Breda, Holanda, Novagen Inc., Madison, WI, USA, Roche Applied Science, Rotkreutz, Suiza), “etiqueta fijadora de quitina” (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), “proteína fijadora de calmodulina” / calmodulina (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Además hay muchas otras combinaciones de moléculas como p.ej. de receptor / ligando, de anticuerpo / antígeno, de lectina / estructura sacárida, etc. Muchas interacciones proteína-proteína ya conocidas actualmente se pueden encontrar en bancos de datos y pueden usarse como módulos espaciadores según la presente invención [28]. Todas las combinaciones de moléculas conocidas actualmente, y que se conocerán en el futuro, capaces de incluir interacciones no covalentes se pueden usar en principio como módulo espaciador en el sentido de la presente invención. Otro procedimiento para introducir módulos espaciadores en moléculas MAT es el uso de moléculas biespecíficas que reúnen dos sitios de unión diferentes en una molécula. Ejemplos de estas moléculas serían lectinas marcadas con biotina (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) capaces de unir p.ej. un módulo marcado con estreptavidina a otro módulo que lleva una estructura sacárida fijada por la lectina. Otro ejemplo de posible acoplamiento son los anticuerpos biespecíficos que reconocen dos epítopos distintos, etc.

Otra variante para insertar módulos espaciadores en moléculas MAT es la siguiente: primero se acoplan entre sí al menos dos módulos mediante un módulo espaciador de unión no covalente y el complejo se trata a continuación con reticulantes químicos que introducen enlaces covalentes entre módulos vecinos. Esto tiene la ventaja de que en la primera etapa se acoplan selectivamente entre sí determinados módulos de manera definida y a continuación el

65

acoplamiento no covalente se convierte en un acoplamiento covalente estable. Si los módulos se tratan directamente con reticulantes que producen uniones covalentes, el acoplamiento resultante entre los módulos suele ser casual e inespecífico.

5 Estructura de las moléculas MAT

En general es posible cualquier disposición de los módulos individuales en la molécula MAT. Cada módulo puede encontrarse una o varias veces en la molécula MAT. Como condición mínima debe haber al menos un módulo de translocación, al menos un módulo de selección de dianas y al menos un módulo de antígeno. Opcionalmente puede haber módulos adicionales, tales como módulos de etiqueta, módulos espaciadores etc., aunque no forzosamente. Todos los módulos pueden encontrarse una o varias veces en la molécula MAT. Cuando hay módulos múltiples, éstos pueden encontrarse como copias idénticas o versiones diferentes de un módulo en copia simple o múltiples copias, respectivamente. También puede haber módulos de la misma clase completamente distintos, p.ej. un módulo His-tag y un módulo de biotina-tag en una molécula MAT. Ambos módulos adoptan funcionalmente la misma tarea (módulo de etiqueta) en la molécula MAT, pero no tienen por qué mostrar ninguna similitud en cuanto a su estructura molecular.

Dos o más copias idénticas de un módulo de antígeno en una molécula MAT pueden servir p.ej. para producir una respuesta inmunitaria reforzada contra el respectivo antígeno. Dos o más módulos de antígeno diferentes se pueden combinar en una molécula MAT, p.ej. para modular simultáneamente la reacción inmunitaria contra dos o más antígenos distintos. En una molécula MAT se usan dos o más módulos de translocación distintos. Por ejemplo, una secuencia de Tat y una secuencia de VP22 pueden servir para hacer más eficiente la translocación de la molécula MAT, de manera que tenga lugar en un amplio espectro de diferentes tipos de células o tejidos. También se pueden usar p.ej. dos o más módulos de etiqueta en una molécula MAT, p.ej. un His-tag y un FLAG-tag, empleándose p.ej. el His-tag para aislar la molécula MAT y el FLAG-tag para detectar la molécula MAT. En una molécula MAT pueden utilizarse dos o más módulos diferentes de selección de dianas, p.ej. una secuencia de la cadena invariante de la molécula MHC II y como módulo adicional de selección de dianas un grupo de manosa-6-fosfato, de los cuales p.ej. la cadena invariante actúa como módulo de selección de dianas en los MHC y el grupo manosa-6-fosfato produce una selección de diana en el lisosoma, lo cual permite aumentar globalmente la eficiencia de la presentación de antígenos o el número de epítomos diferentes del antígeno mostrados por las células que presentan antígenos.

La posición de los módulos individuales dentro de la molécula MAT también se puede variar discrecionalmente mientras exista al menos un módulo de translocación, al menos un módulo de selección de dianas y al menos un módulo de antígeno. En vez de formar una yuxtaposición lineal de módulos, todos o algunos módulos de la molécula MAT también pueden estar p.ej. en forma de estructura circular o ramificada o incluso en forma de dendrímeros, o como una combinación de partes lineales y/o circulares y/o dendrímeras en la molécula. Las estructuras circulares de los módulos de la molécula MAT pueden generarse p.ej. mediante la reacción de dos restos de cisteína entre sí o mediante la reacción de un resto de cisteína con un grupo éster tiólico en una cadena de módulos estructurada originalmente de forma lineal. Hay proveedores comerciales de vectores de expresión suministradores de vectores especiales que mediante estos mecanismos permiten preparar proteínas de fusión circulares, como p.ej. el sistema IMPACT®-TWIN de la firma New England Biolabs, Beverly, MA, USA. Los módulos ramificados podrían prepararse p.ej. mediante síntesis de péptidos, en los cuales, partiendo de poli L-lisina, se añadiera un nuevo resto de lisina a los respectivos restos de lisina sucesivos adyacentes a dos grupos amino libres. De esta manera se puede crear casi cualquier estructura peptídica. A continuación se pueden sintetizar p.ej. módulos de translocación y/o módulos de selección de dianas en el esqueleto peptídico ramificado [32]. Mediante la ligación de proteínas también pueden acoplarse módulos adicionales a una estructura peptídica principal lineal, ramificada o circular [33, 34]. Además en la síntesis de péptidos se pueden introducir p.ej. grupos de biotina en el esqueleto peptídico y a estos grupos de biotina se pueden agregar luego módulos mediante p.ej. estreptavidina, el sistema Strip-Tag o el sistema PinPoint® (IBA GmbH, Göttingen, Alemania o Promega Biosciences Inc., San Louis Obispo, CA, USA) en la estructura peptídica principal. Los módulos así incorporados se acoplan luego al esqueleto peptídico mediante enlaces no covalentes.

La figura 1 muestra algunos ejemplos de cómo pueden formarse las moléculas MAT en cuanto a su composición con diferentes módulos y la disposición de estos módulos dentro de la molécula MAT.

55 Estructura de los módulos de las moléculas MAT

Péptidos, proteínas, aminoácidos, aminoácidos inusuales, modificaciones postraduccionales, etc.

En la presente solicitud de patente los términos péptido y proteína se usan paralelamente con el mismo valor. En la presente invención se entiende por péptido o proteína un compuesto covalente de al menos dos aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico. En la presente invención los términos "aminoácido" y "resto de aminoácido" se usan de modo equivalente, es decir con igual significado. En la presente solicitud de patente, de los términos aminoácido / resto de aminoácido y péptido / proteína se usa la forma más ampliamente definida.

En la presente invención, además de los 20 aminoácidos determinados por el código genético también se entienden como aminoácidos aquellos que pueden codificarse por codones de terminación, como p.ej. seleno-cisteína o pirro-

lisina. Además se incluyen todos los derivados conocidos de aminoácidos y péptidos, como p.ej. los aminoácidos / péptidos sulfatados, fosforilados, glicosilados, así como los isómeros L y D de los aminoácidos y los derivados de aminoácidos y péptidos que se conozcan en el futuro. Los derivados de aminoácidos y péptidos se pueden formar por modificaciones postraduccionales, químicas o enzimáticas o por otros mecanismos, o bien pueden prepararse de manera selectiva. Los péptidos resultantes pueden contener modificaciones en todas las partes de la molécula peptídica. Las modificaciones pueden aparecer por ejemplo en la cadena peptídica principal ("esqueleto peptídico"), en las cadenas laterales de los aminoácidos o en los extremos N-terminales o C-terminales del péptido. Puede haber modificaciones en un solo aminoácido, en varios aminoácidos o en todos los aminoácidos y en un péptido puede haber uno o más tipos de modificaciones, combinadas de cualquier manera, o ninguna modificación. Los péptidos pueden ser ramificados o cíclicos y puede haber cualquier combinación de péptidos cíclicos y ramificados. Los péptidos cíclicos y/o ramificados se pueden formar por procesos biológicos naturales o se pueden producir de manera sintética. Como ejemplos de aminoácidos inusuales cabe mencionar entre otros: ácido alfa-aminobutírico, ácido beta-aminobutírico, ácido beta-aminoisobutírico, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, ácido alfa-aminoadípico, ácido 4-aminobenzoico, aminoetilcisteína, ácido alfa-aminopenicilánico, alisina, ácido 4-carboxiglutámico, cistationina, ácido carboxiglutámico, carboxiamidometilcisteína, carboximetilcisteína, ácido cisteico, citrulina, deshidroalanina, ácido diaminobutírico, ácido deshidroamino-2-butírico, etionina, dipéptido de glicina-prolina, 4-hidroxi-prolina, hidroxilisina, hidroxiprolina, homoserina, homocisteína, histamina, isovalina, lisinoalanina, lantionina, norvalina, norleucina, ornitina, ácido 2-piperidincarboxílico, ácido piroglutámico, pirrolisina, dipéptido de prolina-hidroxi-prolina, sarcosina, 4-selenocisteína, sindesina, tioprolina, etc. Todos los aminoácidos citados pueden existir en forma de su isómero L o D, siempre que lo permita su estructura. En general el término "aminoácido" engloba según la presente invención todos los aminoácidos conocidos actualmente de procedencia natural o producidos o sintetizables por procedimientos enzimáticos, químicos o de otro tipo - así como sus derivados - y los aminoácidos modificados que se conozcan en el futuro. Todos ellos pueden formar parte de las moléculas MAT en el sentido de la presente invención.

Las modificaciones químicas o postraduccionales que puede tener uno o varios módulos de la molécula MAT en la presente invención son, entre otras, variaciones de las secuencias aminoácidos según los siguientes ejemplos de estructura: unión de cisteína libre a una cisteína en la secuencia peptídica, formación de puentes disulfuro entre dos restos de cisteína, metilaciones, acetilaciones, acilaciones, farnesilaciones, formilaciones, geranyl-geranilaciones, biotilaciones, estearoilaciones, palmitilaciones, lipoilaciones, C-manosilaciones, miristoilaciones, fosforilaciones, sulfatilaciones, N-glicosilaciones, O-glicosilaciones, amidaciones, desamidaciones, desmetilaciones, cisteinilaciones, carboxilaciones, hidroxilaciones, yodaciones, oxidaciones, pegilaciones, prenilaciones, ADP-ribosilaciones, 5'-adenosilaciones, 4'-fosfopanteinilaciones, glutatiónilaciones, unión covalente: de flavina, de grupos hemo (u otras porfirinas), de ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos, de lípidos o derivados de lípidos, de fosfatidilinositol, de anclas de glicosilfosfatidilinositol (anclas GPI), de piridoxalfosfato, de manosa-6-fosfato, modificaciones de cisteína a carboxiamidometilcisteína, carboximetilcisteína o piridileticisteína, modificaciones de lisina a ácido lipoico, modificaciones de glutamina a ácido piroglutámico, adición de aminoácidos a péptidos por medio de ARNt, marcaciones de péptidos con ubiquitina, ramificaciones de péptidos p.ej. en forma de poli-L-lisina, ciclaciones de péptidos, p.ej. mediante la formación de puentes disulfuro entre dos restos de cisteína, etc. En la literatura se han descrito muchas otras modificaciones de proteínas que, entre otras partes, están archivadas en bancos de datos [35]. El término "péptido" abarca en general todas las modificaciones de los péptidos actualmente conocidas que se producen de manera natural o que pueden obtenerse por medios enzimáticos o químicos o de otro tipo, así como las modificaciones de péptidos que se conozcan en el futuro. Todas ellas pueden formar parte de las moléculas MAT en el sentido de la presente invención.

Peptidomiméticos

Además, según la presente invención, uno o más aminoácidos de los módulos o todo el módulo o todos los módulos de la molécula MAT se pueden sustituir por estructuras formadas por peptidomiméticos. En la presente solicitud de patente el término peptidomiméticos se emplea en su definición más amplia posible. Un peptidomimético es una sustancia que contiene elementos estructurales no peptídicos y que puede imitar o antagonizar el efecto biológico de la molécula madre natural. En el estado técnico se conocen numerosos trabajos que se refieren explícitamente a la posibilidad de utilizar peptidomiméticos como sustitutos de estructuras peptídicas convencionales. En general uno o varios módulos de la molécula MAT pueden estar formados total o parcialmente por peptidomiméticos [36-38]. Esto puede tener varias ventajas. Así, dado el caso, los módulos de translocación pueden penetrar más eficientemente en las células, los módulos de selección de dianas pueden transportar la molécula MAT de una manera más o menos eficiente y/o específica al orgánulo intracelular deseado, los módulos de antígeno pueden producir una respuesta inmunitaria reforzada o reducida en comparación con la respuesta inmunitaria contra el antígeno corriente, o los módulos de etiqueta pueden tener mejores propiedades fisicoquímicas, lo cual mejora su idoneidad para aislar y/o detectar la molécula MAT, etc. Además, en ciertas circunstancias, el uso de peptidomiméticos puede disminuir o aumentar la estabilidad in vivo de la molécula MAT, disminuir o aumentar su toxicidad, mejorar su solubilidad en medios hidrófilos o hidrófobos, prolongar su estabilidad in vitro y ocasionalmente reducir los costes de síntesis del peptidomimético respecto a los del correspondiente péptido convencional. Un ejemplo de peptidomiméticos son los Spiegelmere de la firma NOXXON Pharma AG, Berlín, Alemania. Este tipo de peptidomiméticos tiene p.ej. la ventaja de que no provocan ninguna respuesta inmunitaria y por tanto podrían utilizarse convenientemente p.ej. en módulos

de translocación, módulos de selección de dianas, módulos de etiqueta, módulos espaciadores, etc. de moléculas MAT. Sin embargo los Spiegelmere no serían adecuados como módulo de antígeno.

Preparación y aislamiento de moléculas MAT

La obtención de moléculas MAT mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes, métodos cromatográficos y protocolos de síntesis química es conocida del especialista. Las moléculas MAT así obtenidas pueden utilizarse para producir medicamentos y productos diagnósticos, así como anticuerpos en animales de experimentación y en sistemas in vitro.

Preparación de moléculas MAT

Entre los métodos conocidos del especialista para obtención de moléculas MAT figura la expresión recombinante de péptidos. Para expresar los péptidos se pueden emplear, entre otros, sistemas celulares como p.ej. bacterias del tipo *Escherichia coli*, células de levadura como *Saccharomyces cerevisiae*, células de insectos como p.ej. las células de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9), o células de mamífero tales como las células de "ovario de hámster chino" (CHO). Estas células se pueden obtener de la "American Tissue Culture Collection" (ATCC) [*Colección americana de cultivos tisulares*]. Para la expresión recombinante de los péptidos se insertan p.ej. secuencias de ácidos nucleicos codificadoras de moléculas MAT íntegras o de módulos individuales de las mismas en combinación con adecuadas secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, tales como p.ej. marcadores de selección, promotores, etc., en un vector de expresión, empleando métodos de biología molecular. Son marcadores de selección adecuados p.ej. las resistencias contra antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, neomicina, puromicina o defectos metabólicos, p.ej. células de levadura que no pueden producir alanina, leucina, triptófano, etc. o células de mamífero a las que les falta el enzima "hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa" y que por ello no pueden sobrevivir en medio HAT (medio de hipoxantina, aminopterina y timidina), etc. Como promotores adecuados cabe mencionar p.ej. el "promotor temprano inmediato del citomegalovirus" (promotor CMV), el promotor mínimo de SP1 o el promotor de timidinacinas (promotor TK). Para cada sistema celular deben elegirse los promotores adecuados. Para las bacterias es adecuado p.ej. el promotor T7 o el T7/lacO, mientras que para p.ej. las células de levadura es adecuado el promotor nmt1. Para moléculas MAT tóxicas o módulos de las mismas puede ser ventajoso o necesario el uso de vectores de expresión que permitan controlar la expresión de estas moléculas desde fuera, p.ej. con el sistema de expresión Tet-On[®] y Tet-Off[®] (Promega Biosciences, San Louis, CA, USA). En este sistema se regula la actividad del promotor de los vectores de expresión mediante la adición de tetraciclina al medio de cultivo de las células. Otros ejemplos de métodos utilizables para la regulación externa de la expresión de moléculas MAT o de sus módulos es la inducción de la polimerasa T7 con IPTG o el empleo de sistemas de expresión inducibles con ecdisona, como p.ej. el sistema "Complete Control[®] Inducible Mammalian Expression System" (Stratagene, La Jolla, MO, USA). Con el uso de vectores que contienen una secuencia IRES ("internal ribosome entry site" [*sitio interno de entrada al ribosoma*]) también se pueden preparar simultáneamente varias moléculas mediante el empleo de sólo un vector de expresión (p.ej. el vector pLP-IRESneo (Promega Biosciences, San Louis, CA, USA). Así al mismo tiempo se pueden expresar y, dado el caso, purificar dos o más módulos de una molécula MAT que deban interactuar entre sí mediante enlaces no covalentes en proporciones estequiométricas adecuadas. Varias firmas ofrecen vectores de expresión que están disponibles en el comercio para diversos sistemas celulares, p.ej. las firmas Invitrogen, Qiagen, Stratagen, Clontech, Novagen, New England Biolabs, Pharmingen, Promega, Pharmacia, etc. Los vectores de expresión así obtenidos pueden introducirse luego en células idóneas del modo conocido para el especialista, p.ej. mediante electroporación, coprecipitación conjunta con fosfato cálcico, transfección mediada por liposomas, etc. Alternativamente pueden utilizarse virus recombinantes producidos por métodos de biología molecular, que luego a su vez infectan células y causan que las células infectadas expresen moléculas MAT o módulos de las mismas. Como sistemas de expresión virales son adecuados p.ej. el sistema de báculovirus, p.ej. BaculoGold (BD Bioscience Pharmingen, Palo Alto, CA, USA), los sistemas de expresión adenovirales como p.ej. ViraPort[®] (Stratagene, La Jolla, CA, USA), los sistemas de expresión retrovirales como p.ej. AdEasy (Stratagene, La Jolla, CA, USA) etc.

Como alternativa a la transfección de vectores de expresión y a los sistemas de expresión virales también se pueden emplear sistemas de translación in vitro, en los cuales se usan p.ej. lisados de reticulocitos de conejo o extractos de *E. coli* S30 o extractos de germen de trigo para la síntesis de moléculas MAT o para la síntesis in vitro de módulos de moléculas MAT, sin necesidad de utilizar células vivas para la expresión.

Sistemas celulares para la preparación de moléculas MAT

Como material de partida para preparar moléculas MAT o módulos individuales de moléculas MAT se pueden usar lisados de células o sobrenadantes de cultivos celulares. Los sistemas celulares pueden obtenerse p.ej. de bacterias tales como p.ej. *E. coli*, bacilos, caulobacterias, pseudomonas o estreptomicetos, o de levaduras tales como p.ej. *Saccharomyces*, *Pichia* o *Hansenula*, o de células de insecto tales como p.ej. Sf-9, Sf-21 o High Five, o de células de mamíferos tales como p.ej. células CHO, células COS, células 3T3, células BHK, células 293, etc. Con el uso de secuencias señalizadoras que producen la exportación de proteínas del interior de la célula al espacio extracelular se puede enriquecer selectivamente la proteína que debe expresarse en el medio de cultivo celular o en el espacio periplasmático de p.ej. bacterias. Otra fuente de materiales de partida para preparar moléculas MAT o módulos de moléculas MAT pueden ser animales transgénicos, plantas transgénicas, hongos transgénicos o microorganismos

transgénicos, en los cuales se han introducido de manera estable o temporal ácidos nucleicos que codifican las moléculas MAT o sus módulos. En este caso los correspondientes ácidos nucleicos pueden integrarse directamente en el genoma del respectivo organismo o se pueden introducir en los organismos p.ej. en forma de plásmidos o en forma de otras moléculas de ADN o de ARN. Luego las correspondientes moléculas MAT o sus módulos se pueden obtener p.ej. de la leche, de los huevos, del suero, de la orina, de los tejidos, etc. de animales transgénicos; p.ej. de tubérculos, semillas, hojas, etc. de plantas transgénicas; p.ej. del micelio, carposoma, etc. de hongos transgénicos, o de células u otros organismos cultivados in vitro o de los correspondientes medios de cultivo celular. Como sistemas de expresión para preparar moléculas MAT o módulos de moléculas MAT son adecuados en general todos los tipos de organismos.

Aislamiento de moléculas MAT

Las moléculas MAT así preparadas o sus módulos pueden aislarse con técnicas conocidas del especialista. Para ello pueden usarse numerosos métodos de aislamiento de proteínas conocidos del especialista, como p.ej. métodos de precipitación, métodos de separación de fases líquidas, métodos cromatográficos, etc. Entre los métodos de precipitación idóneos cabe mencionar la inmunoprecipitación, la precipitación con sulfato amónico, la precipitación con polietilenglicol, la precipitación con etanol, la precipitación con ácido tricloroacético (precipitación TCA), la precipitación térmica, etc. Entre los métodos de separación de fases líquidas cabe mencionar p.ej. la extracción con disolventes orgánicos como p.ej. alcoholes, acetona, cloroformo, acetonitrilo, etc. Entre los métodos cromatográficos cabe citar p.ej. la cromatografía de intercambio catiónico, la cromatografía de intercambio aniónico, la focalización isoelectrica, la cromatografía en fase inversa, la filtración en gel, la cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) - en la cual se pueden utilizar diferentes iones metálicos como p.ej. níquel, cinc, cobalto, etc., la cromatografía en hidroxapatita, numerosos métodos diferentes de cromatografía de afinidad - como p.ej. la cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad mediante el uso de ácidos nucleicos inmovilizados o de inhibidores de proteasa inmovilizados, etc. Los medios cromatográficos empleados pueden estar formados por una matriz de agarosa, por partículas magnéticas, membranas, fibras huecas, diversos polímeros como p.ej. poliestireno, etc. en general los métodos cromatográficos se pueden llevar a cabo a muy diversa escala, empleando pequeñas columnas de cromatografía de pocos μ l de volumen hasta grandes columnas de varios cientos de litros de volumen. Además las cromatografías pueden realizarse a la presión atmosférica normal, a presiones medias en el intervalo de 1 a 50 bar (p.ej. el sistema FPLC, Pharmacia Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y a presiones muy elevadas en el intervalo comprendido hasta 400 bar aproximadamente y, dado el caso, incluso mayores (sistemas HPLC). Las cromatografías pueden realizarse en condiciones nativas o desnaturizantes para las moléculas MAT. En el caso de la cromatografía de afinidad se pueden aprovechar las distintas interacciones entre el material de la matriz y una molécula MAT o módulo de molécula MAT que deba aislarse. En otra parte de la presente solicitud de patente ya se mencionan numerosas moléculas de etiqueta que interactúan con determinados ligandos o grupos funcionales, permitiendo así aislar las moléculas MAT o módulos de moléculas MAT. No obstante se puede usar en principio cualquier tipo de interacción, como p.ej. interacciones proteína-proteína, ácido nucleico-proteína, ácido nucleico-ácido nucleico, azúcar-lectina, azúcar-proteína, receptor-ligando, anticuerpo-antígeno (p.ej. anticuerpos anti-FLAG-Tag, anti-HA-Tag, anti-myc-Tag), hapteno-anticuerpo, Spiegelmer (NOXXON Pharma AG, Berlín, Alemania) etc.

Cromatografía de afinidad

Para la cromatografía de afinidad se puede recurrir especialmente a métodos basados en la unión selectiva de un módulo de etiqueta a una matriz. Las combinaciones adecuadas de módulos de etiqueta con su correspondiente matriz para aislar una molécula MAT son entre otras: histidina-Tag y matriz de quelato de níquel (Qiagen, Hilden, Alemania), GST-Tag y glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), proteína fijadora de maltosa-Tag y matriz de amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), biotina-Tag y matriz de estreptavidina o avidina (IBA GmbH, Göttingen, Alemania), proteína fijadora de quitina y matriz de quitina (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), péptido fijador de calmodulina y matriz de calmodulina (Stratagene, La Jolla, CA, USA), proteína A o proteína G o proteína A/G o proteína L y determinadas regiones de moléculas de anticuerpos reconocidas por la respectiva proteína, como p.ej. la parte Fc de los anticuerpos (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), FLAG-Tag, HA-Tag, myc-Tag, histidina-Tag, etc. y una matriz a la cual va acoplado un anticuerpo contra la respectiva etiqueta (muchas firmas distintas, entre otras Promega Biosciences Inc., San Louis Obispo, CA, USA, Invitrogen, Breda, Holanda, Qiagen, Hilden, Alemania), etc.

Secuencias de reconocimiento de proteasas

Las moléculas MAT o módulos de moléculas MAT así aisladas pueden separarse, si es preciso, de su módulo de etiqueta y/o de otros módulos. Para ello puede insertarse p.ej. una secuencia de reconocimiento de proteasas en posiciones adecuadas del respectivo vector de expresión. El especialista conoce muchas secuencias adecuadas de reconocimiento de proteasas, como p.ej. la trombina, el factor Xa, la enterocinasa o el sistema TAGZyme (Qiagen, Hilden, Alemania). Las proteasas añadidas pueden separarse de nuevo, p.ej. mediante inhibidores de proteasa inmovilizados como p.ej. EK-AWAY para enterocinasa (Invitrogen, Breda, Holanda), Xa Removal Resin (Qiagen Hilden, Alemania), benzamidin-sefarosa para la separación de trombina, etc. Otra posibilidad de aislar moléculas MAT o módulos de moléculas MAT es el uso de inteininas, es decir de proteasas que forman parte de la molécula MAT y luego en condiciones experimentales adecuadas se disocian proteolíticamente por sí mismas del resto de la

molécula MAT o de un módulo de una molécula MAT (Genease[®], New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Según la presente invención todas las secuencias de reconocimiento de proteasas conocidas actualmente [29, 30] y las que se conozcan en el futuro son adecuadas en general para separar componentes de moléculas MAT. Las secuencias de reconocimiento de proteasas pueden ser de origen natural o estar diseñadas específicamente y constar total o

5

Cuerpos de inclusión

Otra forma de ejecución de la presente invención es el uso de moléculas MAT o de módulos de moléculas MAT en forma de agregados proteicos plegados incorrectamente, también denominados "cuerpos de inclusión". Los cuerpos de inclusión se pueden preparar como moléculas que contienen módulos de translocación para facilitar el transporte desde el espacio extracelular, a través de la membrana celular, hacia el interior de la célula. Esta translocación hace que las moléculas inicialmente plegadas de forma incorrecta se plieguen correctamente y luego actúen dentro de la célula como una molécula MAT plegada correctamente desde el principio. Este procedimiento tiene la ventaja de que permite aislar la proteína no plegada en condiciones desnaturizantes, lo cual suele estar relacionado con un esfuerzo técnico, y por lo tanto financiero, menor. Además los cuerpos de inclusión son estructuras relativamente estables. En determinadas circunstancias ello es ventajoso para el almacenamiento y la estabilidad de las moléculas MAT preparadas para un posterior uso médico. Este método también permite emplear según la presente invención las moléculas MAT o módulos de moléculas MAT no plegadas o plegadas incorrectamente. Ciertos módulos de translocación producen tanto un transporte desde el espacio extracelular hacia la célula, como también en sentido inverso. Una molécula MAT aún no plegada correctamente se puede transformar directamente in vivo en el individuo tratado con la molécula MAT o bien se puede plegar in vitro en un sistema celular. Además en ciertas circunstancias el mismo módulo de translocación puede producir la translocación de la molécula MAT no plegada al interior de la célula y la subsiguiente translocación de la molécula MAT plegada luego correctamente al espacio extracelular. Un mecanismo de este tipo está descrito para algunas secuencias que son adecuadas como módulo de translocación en el sentido de la presente invención, como p.ej. la secuencia VP22 [39].

10

15

20

25

Modificación de moléculas MAT

Las moléculas MAT o los módulos de moléculas MAT se pueden modificar mediante numerosos procedimientos enzimáticos, químicos o de otro tipo conocidos del especialista. Por ejemplo, los péptidos se pueden dotar de grupos fósforo mediante cinasas, los grupos fósforo se pueden eliminar utilizando fosfatasas, las estructuras sacáridas se pueden eliminar utilizando glicosidasas, etc. Las correspondientes cinasas, fosfatasas y glicosidasas, etc. y los protocolos correspondientes pueden obtenerse de diversos fabricantes, como p.ej. New England Biolabs, Beverly, MA, USA. La fosforilación de moléculas MAT o de módulos de moléculas MAT también se puede usar para marcar las moléculas MAT o los módulos de moléculas MAT con fósforo radiactivo, lo cual facilita luego su detección in vitro y/o in vivo. Las moléculas MAT o los módulos de moléculas MAT también se pueden modificar mediante reacciones químicas. Por ejemplo, los puentes disulfuro se pueden romper por reducción, los grupos tioéster pueden reaccionar covalentemente con restos de cisteína o dos restos de cisteína pueden reaccionar formando un puente disulfuro, con lo cual se pueden preparar moléculas MAT o módulos de moléculas MAT circulares o ramificados (p.ej. "IMPACT[®]-TWIN Protein Fusion and Purification System", New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Mediante la elección del sistema de expresión también se puede influir selectivamente en las modificaciones de la molécula MAT o de los módulos de las moléculas MAT. Por ejemplo, en las bacterias no tiene lugar ninguna glicosilación y las células de insecto sólo sintetizan determinados tipos de glicosilaciones, mientras que las células de los mamíferos producen glicosilaciones completas. Para la expresión también se pueden usar líneas celulares modificadas o seleccionadas de forma que produzcan determinadas modificaciones postraduccionales de manera selectiva o no selectiva. Estas propiedades ventajosas pueden consistir, entre otras, en una mejor solubilidad en disolventes hidrófilos o hidrófobos, una estabilidad más duradera de la molécula MAT, p.ej. a temperatura ambiente, a 37°C, a 4°C, a -20°C, a -70°C o a otras temperaturas, una estabilidad molecular más duradera de la molécula MAT cuando está sola o mezclada con otras sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, p.ej. en forma de preparados farmacéuticos o productos diagnósticos, una mayor permeabilidad de las moléculas MAT a través de las membranas celulares, de las membranas de los orgánulos, de la barrera hematoencefálica, de la barrera de fluido hemato-cefalorraquídeo y de otras barreras y membranas biológicas, etc., un mayor o menor tiempo de vida medio in vivo o in vitro, una mejor detectabilidad in vivo o in vitro de la molécula, MAT etc.

35

40

45

50

55

Ligación de proteínas

Otra posibilidad de preparar moléculas MAT o módulos de moléculas MAT es la ligación de proteínas. Como tal se entiende p.ej. una reacción química en la que dos extremos de péptidos se unen entre sí covalentemente mediante una o varias reacciones químicas. Un ejemplo sería la reacción de un tioéster con una cadena lateral de cisteína (p.ej. "IMPACT[®]-TWIN Protein Fusion and Purification System", New England Biolabs, Beverly, MA, USA). De este modo se pueden preparar p.ej. péptidos cíclicos. Las moléculas MAT ramificadas se pueden preparar p.ej. mediante síntesis química de péptidos de polilisina, en los que se añaden otros dos restos de lisina a cada lisina (una lisina a cada grupo amino de la lisina), dando como resultado un péptido de polilisina ramificado. A continuación se puede sintetizar una cadena peptídica en cada lisina terminal o añadir un péptido covalentemente por ligación de péptidos. Como estructura soporte de moléculas MAT o módulos de moléculas MAT según la presente invención también se

60

65

pueden usar otros polímeros ramificados. Un ejemplo de ello son las moléculas “PEG star” que pueden obtenerse polimerizando óxido de etileno con divinilbenceno reticulado.

Peptidomiméticos

Otra posibilidad de preparar moléculas MAT o módulos de moléculas MAT es la síntesis química de péptidos o peptidomiméticos [40] o de combinaciones de péptidos y peptidomiméticos. La preparación de moléculas MAT o de módulos de moléculas MAT por síntesis química puede realizarse p.ej. según el protocolo de síntesis en fase sólida de Merrifield usando máquinas automáticas de síntesis o productos químicos de síntesis, que pueden obtenerse de varios fabricantes. Un ejemplo de una firma que ofrece síntesis de peptidomiméticos es “The Peptide Laboratory[®]”, Benicia, CA, USA. En Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA se pueden adquirir p.ej. numerosos componentes de síntesis para péptidos usuales y peptidomiméticos.

Composición de medicamentos y productos diagnósticos

Las proporciones de péptidos, aminoácidos, derivados de aminoácidos, peptidomiméticos, etc. de las moléculas MAT contenidos en los medicamentos y productos diagnósticos también pueden encontrarse en forma de sus sales, siempre estas sales sean farmacológicamente aceptables. Los medicamentos o productos diagnósticos previstos para inyectar pueden ser p.ej. disoluciones acuosas u oleosas estériles, mezclas según el estado técnico con sustancias auxiliares adecuadas, como p.ej. agentes dispersantes, humectantes y estabilizantes de suspensión. Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar con disolventes o diluyentes farmacológicamente aceptables, como p.ej. 1,3-butanodiol. Como disolventes y sustancias tampón aceptables pueden utilizarse entre otros agua, solución Ringer, soluciones isotónicas de cloruro sódico, etc. Además pueden utilizarse aceites estériles, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Asimismo puede recurrirse a ácidos grasos tales como p.ej. el ácido oleico para la preparación de las soluciones inyectables. También puede emplearse dimetilacetamida, detergentes, incluyendo detergentes iónicos y no iónicos, polietilenglicoles, etc. También son posibles las mezclas de las sustancias arriba citadas. Además también pueden prepararse medicamentos en forma de mezclas con polímeros biológicamente degradables que liberan los fármacos de manera continua. Un ejemplo de este tipo de sistema es el sistema Atrigel (Atrix Labs, Fort Collins, CO, USA).

Para aplicaciones por vía rectal se pueden emplear preparados compuestos por mezclas de moléculas MAT y dado el caso otras sustancias con una base o un relleno untuoso no irritante, como p.ej. manteca de cacao, mono, di o triglicéridos sintéticos, ácidos grasos o polietilenglicol. También pueden llevar colorantes, conservantes y sustancias aromatizantes. Estas y otras sustancias idóneas son sólidas a temperatura ambiente y se derriten a la temperatura corporal, liberando las sustancias contenidas.

Para la aplicación por vía oral se pueden usar, entre otras, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, etc. En estas formas de administración los principios activos de los medicamentos y productos diagnósticos se suelen combinar con adyuvantes adecuados para la presentación farmacéutica correspondiente. Las sustancias se pueden elaborar con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa, ácidos alcanoicos, ésteres alquílicos de celulosa, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales sódicas o cálcicas del ácido fosforoso o sulfuroso, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), etc. para hacer p.ej. comprimidos, cápsulas, etc. Estas cápsulas, comprimidos, etc. pueden contener además sustancias que permiten o promueven una liberación controlada de los principios activos, como p.ej. hidroxipropilmetilcelulosa. Además pueden contener sustancias tampón tales como citrato sódico, carbonato o bicarbonato magnésico o cálcico, etc. Otros componentes pueden ser colorantes, aromatizantes, saborizantes, conservantes y edulcorantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, etc. pueden llevar además recubrimientos que por un lado los hacen resistentes al ácido gástrico, pero por otro lado favorecen su disolución en el medio alcalino del intestino.

Para la aplicación por vía oral también se pueden usar emulsiones líquidas, soluciones, jarabes y preparados en forma de gel farmacéuticamente aceptables. Los preparados pueden contener disolventes empleados en medicina, tales como p.ej. agua, etanol, etc. Estos preparados también pueden llevar adyuvantes, humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, etc., así como edulcorantes, saborizantes, colorantes, conservantes y aromatizantes.

Los preparados líquidos previstos para inyectar se pueden obtener a partir de polvos estériles o de granulado por disolución en disolventes acuosos o no acuosos. Los polvos y granulados en los que se basan estas disoluciones pueden contener una o varias de las sustancias mencionadas para los medicamentos de administración oral. Son disolventes adecuados, entre otros: agua, polietilenglicol, polipropilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de coco, alcohol bencílico, disoluciones de cloruro sódico u otros varios tampones. Como componentes adicionales pueden llevar colorantes, conservantes, etc.

La cantidad de moléculas MAT y de otros ingredientes contenida en los medicamentos depende de la forma y de la frecuencia de administración, de la vía de administración elegida, de la edad, sexo, peso y estado de salud del paciente, etc. Además hay que tener en cuenta si el tratamiento se realiza con fines diagnósticos, terapéuticos o profilácticos, o para aumentar o reducir la reacción inmunitaria. Para la formulación y dosificación de medicamentos hay numerosos trabajos conocidos del especialista [41, 42].

Vías de aplicación de los medicamentos y productos diagnósticos de la presente invención

Los medicamentos y productos diagnósticos de la presente invención se pueden administrar por distintas vías al paciente o a un animal de experimentación que deba inmunizarse. Entre estos métodos cabe citar la administración por vía oral y sublingual, p.ej. comprimidos, grageas, cápsulas, granulado, soluciones líquidas, polvos para disolver en líquidos, etc. Las grageas, los comprimidos, los granulados y las cápsulas pueden formularse de manera que los medicamentos pasen por el estómago sin ser alterados por medio ácido del mismo y solo liberen los ingredientes del fármaco al llegar al intestino. Además los medicamentos también se pueden administrar por aplicación tópica sobre la piel o las mucosas, p.ej. pomadas, aerosoles, polvos, tinturas, etc. o por inhalación de aerosoles a través de las mucosas de p.ej. las vías respiratorias. También es posible la aplicación por vía rectal en forma de supositorios, enemas, etc. Para la aplicación transdérmica de los medicamentos también pueden utilizarse sustancias auxiliares como p.ej. células dendríticas, linfocitos L, macrófagos y otras células similares a los macrófagos, etc. Como ejemplo adicional, se pueden tratar células de animales de experimentación o líneas celulares con moléculas MAT. Las células tratadas pueden administrarse luego al paciente o al animal de experimentación, bien como células vivas – inactivadas, sin capacidad de división – o como células muertas. Las células inactivadas o muertas se pueden obtener p.ej. tratándolas con sustancias adecuadas o irradiándolas, p.ej. con radiación radiactiva o ultravioleta. Otra posibilidad de aplicación de los medicamentos, en particular de las moléculas MAT de la presente invención, es la transfección estable o temporal de células animales, humanas o vegetales con un vector que exprese una molécula MAT. Dado el caso, las células modificadas de este modo se pueden incluir en una matriz, que por un lado las fija localmente y las protege del sistema inmunitario del paciente o del animal de experimentación, pero por otro lado deja escapar las moléculas MAT liberadas por las células al organismo del paciente o del animal de ensayo. En determinadas circunstancias las células transfectadas también se pueden administrar directamente al paciente o al animal de experimentación, tratándolas si es preciso de modo que no puedan dividirse más, p.ej. por radiación o con productos químicos adecuados. Además los medicamentos pueden administrarse envueltos en liposomas u otras vesículas, como p.ej. exosomas o dexosomas, o en forma de mezclas con polímeros biológicamente degradables que liberan los medicamentos de manera continua. Un ejemplo de sistema de este tipo es el sistema Atrigel (Atrix Labs, Fort Collins, CO, USA). Asimismo, a través de la misma vía o de una o más vías de aplicación, se pueden administrar otras sustancias de modo simultáneo o diferido respecto a la administración del medicamento o producto diagnóstico de la presente invención. Entre otras cosas, estas sustancias pueden mejorar el efecto de los fármacos o productos diagnósticos de la presente invención gracias a sus propiedades inmunoestimulantes. Estas sustancias administradas de manera simultánea o diferida pueden ser, entre otras adyuvantes, aceite mineral, adyuvante de Freund, proteínas inmunoestimulantes o mediadores tales como p.ej. citocinas, otras vacunas, etc. Además, dado el caso, también es útil la administración simultánea o diferida de sustancias inmunosupresoras para reducir o suprimir p.ej. reacciones inmunitarias locales no deseadas, pero manteniendo las reacciones inmunitarias sistémicas. A la inversa, la administración simultánea o diferida de sustancias inmunosupresoras también puede servir para impedir reacciones inmunitarias sistémicas, manteniendo las reacciones inmunitarias locales.

Posibilidades de comprobación de la eficacia de las moléculas MAT

Para comprobar la eficacia de moléculas MAT respecto a una modulación de la respuesta inmunitaria de un sujeto se pueden llevar a cabo varios ensayos in vitro e in vivo.

Como modelo in vitro son adecuadas p.ej. las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenidas p.ej. de la sangre de pacientes afectados de enfermedades alérgicas. Estas células tienen la ventaja de que a menudo se conoce el antígeno exacto contra el cual reacciona alérgicamente el respectivo paciente. Este conocimiento permite por ejemplo simular in vitro una desensibilización del paciente, antes de llevar a cabo estudios clínicos en el paciente o en animales de experimentación. Para ello las PBMC de personas alérgicas se pueden tratar p.ej. con el antígeno respectivo contra el cual reacciona el alérgico o con una molécula MAT que contenga el alérgeno correspondiente en el módulo de antígeno. Así se puede examinar la reacción inmunológica de las células primarias del paciente frente a diferentes formas de administración (molécula MAT completa, moléculas con/sin módulo de translocación, moléculas con/sin módulo de selección de dianas, etc.) del alérgeno. Como parámetro de medición se proponen entre otros las determinaciones de citocina en el sobrenadante del cultivo celular. En la respuesta inmunitaria contra un antígeno intervienen diferentes tipos de células T, como p.ej. células T auxiliares del tipo 1 (células Th1) o del tipo 2 (células Th2) o del tipo 0 (células Th0). El tipo de las células T involucradas en cada caso tiene gran influencia para saber si se desencadena una respuesta inmunitaria contra el antígeno, que fundamentalmente consiste en inmunoglobulinas de clase E (IgE) o de clase G (IgG). De la literatura se sabe que las respuestas inmunitarias de IgE son especialmente responsables de las reacciones alérgicas y del asma, mientras que las respuestas inmunitarias de IgG están relacionadas en general con una tolerancia frente al antígeno. El tipo respectivo de célula T activado mediante el tratamiento de las PBMC con un antígeno también se puede determinar p.ej. analizando la expresión de antígenos sobre la superficie celular o analizando mensajeros tales como p.ej. las citocinas liberadas por las PBMC. Como marcadores de una respuesta inmunitaria Th1 se puede determinar p.ej. el interferón-gamma (IFN γ) o la interleucina-1 (IL-1) en el medio de cultivo celular, mientras que IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 indican una respuesta inmunitaria Th2. Estas citocinas se pueden detectar por métodos estándar conocidos del especialista como p.ej. determinaciones ELISA de p.ej. sobrenadantes de cultivos celulares o análisis FACS de los mensajeros presentes en la superficie o en el interior de las células PBMC, o análisis Western blot de sobrenadantes de cultivos celulares o

de lisados celulares, etc. De la literatura se conocen muchos otros métodos para estos u otros mensajeros [43, 44]. Aparte de los mensajeros liberados por las PBMC también puede recurrirse a mensajeros intracelulares o unidos a la membrana o a otras proteínas para la caracterización inmunológica de las células T en las PBMC. Pharmingen, San Diego, CA, USA, Beckmann Coulter Inc., Fullerton, CA, USA, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA, entro otras firmas, ofrecen muchos anticuerpos adecuados para tales ensayos. Sin embargo los ensayos respectivos no sólo pueden realizarse con células primarias del paciente, sino también con células obtenidas de animales de experimentación tratados correspondientemente, p.ej. de ratones, ratas, cobayas, etc. Estos ensayos con animales de experimentación tienen la ventaja de que no solo hay que trabajar con las células de estos animales in vitro, sino que el sistema inmunitario puede examinarse in vivo con un organismo intacto. De esta manera también se puede estudiar el efecto de la dosificación, la composición y la forma de administración de las moléculas MAT, así como de los respectivos controles, como p.ej. moléculas que solo constan de un antígeno o de un módulo de translocación y un módulo de antígeno o de un módulo de selección de dianas y un módulo de antígeno. Se puede estudiar entre otras cosas si existen diferencias en el tipo de la respuesta inmunitaria cuando las moléculas MAT o los respectivos controles se inyectan de forma convencional por vía subcutánea o cuando la inyección se realiza p.ej. directamente en nódulos linfáticos. También se puede examinar el efecto de las administraciones no invasivas, p.ej. por vía oral o sublingual, de las moléculas MAT y los respectivos controles. Otro ensayo que puede llevarse a cabo en un animal de experimentación es la aplicación de las moléculas MAT o de los controles respectivos con y sin administración simultánea de adyuvantes tales como p.ej. aceite mineral, extractos de micobacterias o adyuvante de Freund. También se puede establecer el programa de tiempo más eficaz o tolerable de las inmunizaciones que deben realizarse, así como las dosis y el número de inmunizaciones. Asimismo se puede ensayar la efectividad de diversos módulos de antígeno. Así se puede establecer la mejor estrategia de inmunización para posteriores estudios en pacientes humanos.

Además de los mensajeros, de las proteínas intracelulares y de las proteínas superficiales, las inmunoglobulinas también son especialmente adecuadas para la caracterización de la reacción inmunitaria de las células cultivadas in vitro o de la reacción inmunitaria de los animales de ensayo o de los pacientes humanos en estudios clínicos. Con la técnica ELISA, p.ej., se puede analizar y cuantificar si los anticuerpos liberados a causa de la administración del alérgeno o del antígeno son del tipo IgE o IgG. Estas informaciones explicarían de qué tipo de reacción inmunitaria se trata.

Como los mensajeros liberados por las células T también influyen entre otras cosas en la proliferación de células del sistema inmunitario, las cuales se encuentran entre otras en las preparaciones de PBMC, la respuesta inmunitaria también se puede caracterizar determinando la proliferación de células como p.ej. las PBMC. Para ello se pueden realizar p.ej. ensayos in vitro - p.ej. estudios de incorporación de timidina marcada con tritio al ADN - como prueba de crecimiento celular. En estos estudios también se pueden aplicar muchos otros métodos de determinación de la proliferación celular conocidos del especialista. La proliferación de determinadas células del sistema inmunitario también se puede determinar in vivo, p.ej. llevando a cabo ensayos FACS con muestras de sangre de animales de experimentación o de pacientes humanos participantes en estudios. Seleccionando anticuerpos adecuados se pueden cuantificar p.ej. las distintas subpoblaciones de tipos celulares existentes en la sangre. De este modo se puede estudiar el efecto de un tratamiento con moléculas MAT o con los respectivos controles.

Ejemplos prácticos

Los siguientes ejemplos de ejecución están ideados para ilustrar la presente invención a modo de ejemplo, pero en sin ningún caso deben limitar su ámbito de protección.

Ejemplo 1:

Clonación de vectores de expresión para moléculas MAT

Todos los procedimientos de biología molecular descritos a continuación se realizaron según métodos normalizados conocidos del especialista [43]. Para clonar un vector de expresión de las moléculas MAT (moléculas modulares de transporte de antígenos) se utilizó el vector pQE-30 (Qiagen, Hilden, Alemania).

En una primera etapa de trabajo se insertó en un vector de expresión bacteriano una secuencia de ácido nucleico que codifica un módulo de translocación. La secuencia de ADN que codifica los aminoácidos GYGRKKRRQRRR de VIH-Tat se insertó en el vector pQE-30 mediante oligonucleótidos sintéticos. Además de secuencia de VIH-Tat los oligonucleótidos contenían una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción Bgl II en el extremo 5' y secuencias de reconocimiento de BamH I, Spe I, Pst I y Hind III en el extremo 3'. A continuación la secuencia de VIH-Tat producida sintéticamente se cortó con Bgl II y Hind III y el vector pQE30 se cortó con las endonucleasas de restricción Bam HI y Hind III. A continuación la secuencia Tat y el vector pQE30 se aislaron con NucleoSpin Extract 2 in 1 (Macherey-Nagel, Oensingen, Suiza), se juntaron con ligasa, se transformaron en bacterias competentes por electroporación y se dispusieron sobre placas de agar que contenían ampicilina. Se seleccionaron algunas de las colonias bacterianas resultantes y se aisló de ellas ADN vectorial. Los vectores así obtenidos se secuenciaron por métodos estándar para confirmar la secuencia de ácidos nucleicos. Los clones bacterianos que contenían vectores con la secuencia correcta se utilizaron en los siguientes trabajos. En una segunda etapa se insertó en el vector un

módulo de selección de dianas. Para ello se aisló ARNm de células mononucleares periféricas (PBMC) humanas mediante métodos estándar conocidos del especialista y se transcribió a ADN complementario (ADNc) empleando PCR con transcriptasa inversa. Con el empleo del ADNc resultante y distintos cebadores de PCR que incorporaron una secuencia de reconocimiento de Bgl II en el extremo 5' del producto de PCR y secuencias de reconocimiento de Spe I, Bam H I, Pst I y Hind III en el extremo 3' de los productos de PCR se obtuvo la secuencia de ácidos nucleicos de la cadena invariante humana de la molécula MHC II que codifica los aminoácidos 1 a 110 de la cadena invariante de MHC II. Esta región de la secuencia de la cadena invariante del MHC II se incorporó, según la primera etapa de trabajo, tras el extremo 3' de la secuencia Tat ya insertada en el vector pQE-30. La secuencia del vector resultante se confirmó por secuenciación. Empleando métodos estándar conocidos del especialista, en la posición 292 se reemplazó citosina por timidina y en la posición 318 guanina por adenina, en ambos casos mediante mutagénesis sitio-dirigida. Estas dos mutaciones puntuales no modifican la secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína, solo eliminan secuencias de reconocimiento no deseadas de endonucleasas de restricción. En una tercera etapa se insertó finalmente un módulo de antígeno en el vector. Utilizando el vector pQE-30, en el que previamente se había insertado la secuencia codificadora del respectivo antígeno, y cebadores de PCR que incorporan una secuencia de reconocimiento de Spe I y/o BamH I en el extremo 5' del producto de PCR y un codón de terminación y una secuencia de reconocimiento de Pst I o Hind III en el extremo 3' del producto de PCR, se obtuvieron secuencias de ácidos nucleicos de distintos antígenos. Como módulo de antígeno se obtuvo entre otros la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos 1 a 222 del antígeno Der p 1 (respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína Der p 1 madura). Esta región de la secuencia del antígeno Der p 1 se incorporó, según las dos primeras etapas de trabajo, tras el extremo 3' de la secuencia de la cadena invariante del MHC II ya insertada en el vector pQE-30. Las secuencias correctas de los vectores resultantes se confirmaron por secuenciación. Los vectores de expresión para los siguientes trabajos se prepararon mediante el uso de QIAfilter Plasmid Midi-Kits (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante.

25 Ejemplo 2:

Obtención de la secuencias codificadoras de los antígenos Bet v 1, Asp f 1, Asp f 6 y Der p 1

Las secuencias codificadoras de los diversos antígenos de los módulos de antígeno se aislaron mediante distintos métodos conocidos del especialista [43]. La secuencia Bet v 1 se preparó mediante oligonucleótidos sintéticos, las secuencias Asp f 1 y Asp f 6 se obtuvieron en estudios anteriores a partir de los vectores empleados en ellos [45, 46] y luego se insertaron en el vector pQE-30; la secuencia Der p 1 se aisló por PCR con transcriptasa inversa a partir de ácaros de polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

35 Ejemplo 3:

Expresión y aislamiento de moléculas MAT en bacterias

La expresión y el aislamiento de las moléculas MAT se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). En concreto se inició un cultivo previo de bacterias *E. coli* M 15 transfectadas con el vector de expresión respectivo (pQE-30-molécula MAT) en 20 ml de medio (2x medio YT, 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina), por la noche, a 37°C en el agitador de bacterias. Luego el cultivo previo se cultivó en 2000 ml de medio (2x medio YT, 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina) a 37°C en el agitador de bacterias, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm de longitud de onda. Después de añadir IPTG hasta una concentración final de 1 mM y tras una nueva fase de crecimiento de 4 a 15 h se separaron las bacterias del medio de cultivo centrifugando a 2000 g durante 20 minutos y el sedimento de bacterias se conservó a -20°C. Para obtener los lisados celulares el sedimento bacteriano se descongeló y se resuspendió en solución de urea 8 M (5 ml de solución de urea por gramo de peso húmedo del sedimento bacteriano), se agitó con cuidado durante 1 a 2 h y luego se centrifugó durante 30 min a 48000 g. El sobrenadante transparente se utilizó para la cromatografía preparativa de las moléculas MAT con quelato de níquel. Para aislar las moléculas MAT se emplearon columnas de 49 o 18 ml (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) rellenas con 5 hasta 10 ml de NI-NTA Superflow Matrix (Qiagen) y un sistema de cromatografía de la firma Bio-Rad (Econo Pump y monitor UV). Primero se lavó la columna cromatográfica con 5 volúmenes de columna de tampón A (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris/HCl 10 mM, guanidina-HCl 6 M, pH ajustado con HCl a 8,0) y luego se aplicó a la columna el lisado bacteriano a un caudal de 1,4 ml/min. A continuación se bombaron respectivamente a la columna 5 a 10 volúmenes de columna de tampón A y tampón B (tampón B: NaH₂PO₄ 100 mM, Tris/HCl 10 mM, urea 8M, pH 8,0) a un caudal de 1,4 ml/min y se observó la absorción del flujo a una longitud de onda de 280 nm (A280). Al alcanzar el flujo una A280 estable, inferior a 0,01 aproximadamente, la columna se lavó con 5 hasta 10 volúmenes de columna de tampón C (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris/HCl 10 mM, urea 8M, pH ajustado con HCl a 6,3) hasta alcanzar finalmente una A280 estable inferior a 0,01. A continuación la molécula MAT se eluyó con tampón E (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris/HCl 10 mM, urea 8M, pH ajustado con HCl a 4,5) y se recogió.

65 Ejemplo 4:

Detección de moléculas MAT con geles de SDS-poliacrilamida, tinción de Coomassie y Western blot anti-His

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida:

Para la electroforesis se utilizaron tampones, geles NuPAGE® y una cámara de electroforesis Xcell SureLock® de Invitrogen (Invitrogen Life Technologies, Breda, Holanda) según las indicaciones del fabricante. De las moléculas MAT aisladas se separaron electroforéticamente 5 o 10 µg por calle en geles bis-tris NuPAGE® Novex al 12% (Invitrogen), a una tensión constante de 200 V, usando el tampón de muestra SDS NuPAGE® 1x concentrado en condiciones reductoras durante un tiempo de 35 a 50 min. Como tampón de migración se usó tampón MES o MOPS (tampón MES: MES 50 mM (ácido morfolinoetanosulfónico), Tris/HCl 50 mM, SDS 3,5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3, tampón MOPS: MOPS 50 mM (ácido (3-(N-morfolino)propanosulfónico), Tris/HCl 50 mM, SDS 3,5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,7).

Tinción con azul de Coomassie:

Para teñir los geles, éstos se incuban durante 1 h en solución de tinción (200 ml de metanol, 50 mg de ácido acético, 250 ml de agua, 0,5 g de azul de Coomassie R-250) y a continuación se decoloran, cambiando varias veces la disolución decolorante (200 ml de etanol, 50 ml de ácido acético, 250 ml de agua), hasta que el fondo de los geles es transparente. Para la electrotransferencia de las proteínas desde el gel NuPAGE® a una membrana se utiliza el Xcell II® Blot Modul (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. El dispositivo de transferencia se monta según las indicaciones del fabricante, empleando el tampón de transferencia NuPAGE® 1x con el 10 o el 20% de metanol. Para la transferencia se emplearon membranas de PVDF y la electrotransferencia duró 1 h a una tensión constante de 30 V.

Detección inmunológica de las moléculas MAT:

La detección inmunológica de las moléculas MAT se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante utilizando anticuerpos anti-His (anti-RGS(His)4, Qiagen, Hilden, Alemania). Todas las etapas del ensayo tienen lugar a la temperatura ambiente. Primero se seca la membrana de PVDF y luego se incuba directamente - sin bloqueo previo de los sitios de fijación de proteína - con el anticuerpo anti-His (Qiagen) a una dilución de 1:1000 hasta 1:2000 en TBS (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) con 3% de BSA (albúmina de suero bovino) durante 1 h. Después la membrana se lava 3x, durante 10 min respectivamente, con TBS, Tween 20 al 0,05%, Triton X-100 al 0,2% y luego se lava una vez con TBS sin aditivos adicionales. Como anticuerpo secundario se utiliza el conjugado anti-Ig de ratón-HRP (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) a una dilución de 1:10000 a 1:20000 en TBS con leche en polvo al 10% y se incuba durante 1 h. Por último la transferencia se lava 4x, durante 10 min respectivamente, con TBS, Tween 20 al 0,05%, Triton X-100 al 0,2%. El conjugado se detecta con el sistema ECL® (Amersham) según las indicaciones del fabricante. La señal quimioluminiscente se detecta mediante el uso de películas de autorradiografía que se revelan según protocolos estándar.

Ejemplo 5:

Translocación de moléculas MAT en líneas celulares y células humanas primarias

Siguiendo métodos estándar conocidos del especialista se obtuvieron células PBMC (células mononucleares de sangre periférica) por centrifugación de gradiente de densidad con el uso de Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia), partiendo de sangre fresca humana de probandos voluntarios, tratada con heparina. La línea celular Jurkat se obtuvo de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, USA). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía los siguientes aditivos: 10% de suero bovino fetal, 200 unidades/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomina, vitaminas MEM, aminoácidos MEM no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol al 0,001%. Para determinar la translocación se suspendieron de nuevo las células a una concentración 1×10^6 /ml de medio RPMI con todos los aditivos. Las células se incubaron siguiendo las indicaciones de las respectivas leyendas de las figuras, a una concentración de 0,01 a 5 mM de moléculas recombinantes o moléculas MAT durante un tiempo de 5 min a 4, 22 o 37°C. A continuación se centrifugaron las células y el sedimento celular se incubó en 40 µl de tampón de lisis (urea 8 M, fosfato sódico 100 mM, Tris/HCl 10 mM, cloruro amónico 100 mM) durante 5 min a la temperatura ambiente. Los componentes celulares insolubles se separaron por centrifugación (15000 g, 15 min) y el lisado transparente se siguió analizando por Western blot como en el ejemplo 4. Para detectar las proteínas se utilizó un anticuerpo anti-His.

Ejemplo 6:

Estimulación de células mononucleares periféricas de la sangre (PBMC) de pacientes con alergias

Los métodos descritos a continuación para estimular las células PBMC y determinar la proliferación de las células PBMC estimuladas se encuentran en la literatura [44]. Las PBMC se aislaron por centrifugaciones de gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia), partiendo de sangre fresca humana de probandos voluntarios, tratada con heparina. Los probandos voluntarios eran pacientes con alergia a un alérgeno conocido del paciente individual. Los pacientes fueron informados adecuadamente según las leyes suizas acerca de los experimentos realizados con sus muestras sanguíneas y con ello declararon estar de acuerdo en participar en el estudio. Una vez obtenidas las PBMC, éstas se introdujeron en medio RPMI con los aditivos correspondientes al

ejemplo 5 y se añadieron respectivamente 0,01 hasta 100 nM del antígeno producido de forma recombinante contra el cual cada paciente reacciona alérgicamente. Se examinó en cada caso el antígeno no modificado y el antígeno (molécula MAT) acoplado a un módulo de translocación y un módulo de selección de dianas. En algunos ensayos también se hicieron mezclas de prueba en las que no había acoplado ningún módulo de selección de dianas, sino sólo un módulo de translocación y el módulo de antígeno (figura 7A). En algunos ensayos también se utilizaron como controles solo el módulo de translocación o un constructo compuesto de módulo de translocación y módulo de selección de dianas, pero sin módulo de antígeno. Después de un tiempo de incubación de 5 días se añadieron al medio 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina marcada con tritio. La incorporación de timidina a las PBMC se determinó como medida de la eficacia de la presentación de antígenos y de la proliferación de las células tratadas relacionada con ella. Para ello, después de 8 a 10 h se separó el medio radioactivo de cultivo celular y se determinó la cantidad de timidina radioactiva incorporada midiendo la radiactividad. Para ello se utilizó un contador de centelleo 1205 Betaplate Liquid de la firma Wallac ADL AG, Hünenberg, Suiza. Como control se incubaron células no estimuladas con antígeno, asimismo con timidina marcada con tritio, y a continuación se analizaron de la misma manera. Como resultado se obtiene un valor de medición de la timidina radioactiva incorporada, que es una medida de la proliferación y por tanto de la eficiencia de la presentación de antígenos. Cuanto mayor es la incorporación de timidina, más eficiente es la presentación de antígenos. Como en cada ensayo se estudiaron concentraciones de antígeno de 0,01 nM a 100 nM, también se puede determinar a qué concentración de antígenos tiene lugar la máxima presentación de antígenos. Cuanto menor es esta concentración, más efectivo es el antígeno como modulador de una respuesta inmunitaria. Como control adicional se trataron células con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-CD3 y de un anticuerpo anti-CD28 respectivamente, lo cual representa un estímulo de proliferación muy intenso. De este modo se pudo determinar para cada ensayo la máxima incorporación posible de timidina mediante la proliferación de células PBMC.

Ejemplo 7:

25 Liberación de citocinas estimulada por moléculas MAT

Se aislaron células PBMC de la sangre de alérgicos, del modo descrito en el ejemplo 5, y se diluyeron a $1 \times 10^6/\text{ml}$ de medio. Se sembraron respectivamente 100 μl de esta suspensión celular en placas de 96 pocillos y se trataron durante 5 días con 0,01 hasta 1000 nM del antígeno aislado. Durante este tiempo no se cambió el medio del cultivo celular. Después de centrifugar las placas de 96 pocillos se recogieron los sobrenadantes y se conservaron a -20°C hasta el análisis de las citocinas. Las células PBMC se trataron respectivamente con el antígeno contra el cual había reaccionado alérgicamente el paciente del que se aislaron las células PBMC. En los sobrenadantes así obtenidos se buscaron las siguientes citocinas: interferón gamma (INFg), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-5 (IL-5). Las figuras 8A y 8B muestran los resultados obtenidos con las células PBMC de pacientes que reaccionan alérgicamente contra Bet v 1. Los inmunoensayos (ELISA = Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay [*Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas*]) de INFg, IL-10 e IL-5 se llevaron a cabo según métodos conocidos del especialista mediante el empleo de los sistemas de desarrollo de ELISA "Duoset[®]" de la firma R & D Systems Inc., Minneapolis, USA.

Paralelamente a la obtención de los sobrenadantes para las determinaciones de citocinas también se realizaron ensayos de estimulación con células PBMC de los mismos donantes, según el ejemplo 6. Los resultados de estos ensayos de proliferación celular también están representados en las figuras 8A y 8B.

Ejemplo 8:

45 Efecto in vivo de antígenos no modificados y de antígenos existentes en el módulo de antígeno de moléculas MAT

Para comprobar la efectividad de las moléculas MAT se inmunizaron 3x ratones CBA/2 a intervalos respectivos de tiempo de 2 semanas con moléculas MAT producidas de forma recombinante, junto con hidróxido de aluminio como adyuvante, según un procedimiento conocido del especialista. Las moléculas MAT recombinantes se obtuvieron del modo descrito en el ejemplo 3. Se usaron 3 vías distintas de inmunización. En cada serie de ensayos los antígenos y los controles se inyectaron por vía subcutánea, intraperitoneal e intranodal. En la inyección intranodal se dejó el tejido operativamente al descubierto para poder inyectar directamente. Como molécula MAT se usó una proteína formada por la secuencia VIH-Tat como módulo de translocación, la cadena invariante humana como módulo de selección de diana y el péptido PLA2 (fosfolipasa del veneno de abeja) como módulo de antígeno (denominación: trans-target-PLA2). Como control se usó PLA2 (denominación: PLA2) y como control adicional solución de cloruro sódico al 0,9% (denominación: control). La inmunización intranodal se llevó a cabo con 0,1 μg y la inmunización subcutánea e intraperitoneal con 10 μg de molécula MAT o cantidades adecuadas de proteína de control o tampón de control, junto con hidróxido de aluminio como adyuvante. Se inmunizaron 3 animales por cada grupo de ensayo; por lo tanto se usaron 9 animales por cada ensayo. Se realizaron 3 series de ensayos y en cada una de ellas se experimentó otra vía de inmunización (subcutánea, intraperitoneal, intranodal). Antes de la primera inmunización y luego a las 2, 4 y 6 semanas se extrajo sangre de cada animal de ensayo por la vena caudal. La sangre se coaguló a la temperatura ambiente y el suero se obtuvo a continuación por centrifugación y se conservó a -20°C hasta el análisis. Los sueros así preparados se usaron para determinar los títulos de IgG e IgE específicos de PLA2.

65 Determinación de los títulos de IgG2a específicos de PLA2 en los sueros de ratón

Para determinar el título de IgG2a específico de PLA2 se recubrieron placas de microvaloración (de 96 pocillos) por la noche con 100 µl/pocillo de una solución de 5 µg/ml de PLA2 (Sigma-Aldrich, Buchs DG, Suiza) en tampón de carbonato a 4°C. Después de 2x lavados con solución de cloruro sódico tamponada con fosfato (PBS) y Tween al 0,05% se bloquearon sitios libres de fijación de proteína incubando con tampón de bloqueo (PBS, 2,5% de leche desnatada), 200 µl/pocillo, a la temperatura ambiente durante 1 a 2 h. Se lavó 2x de nuevo y a continuación se incubaron series de dilución 1:2 en tampón de bloqueo (50 µl/pocillo) de las muestras de suero objeto del ensayo (diluciones 1:2 hasta 1:64) durante 3 h a temperatura ambiente o por la noche a 4°C. Como controles negativos se realizaron incubaciones sin suero o con suero de animales no tratados. Después se lavó 5x y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente (100 µl/pocillo) con una dilución 1:500 en tampón de bloqueo de una IgG2a anti-ratón marcada con biotina (PharMingen GmbH, Hamburgo, Alemania) y se lavó de nuevo 5x. Por último se incubaron 1 h a temperatura ambiente 100 µl/pocillo de una peroxidasa de rábano picante diluida 1:1000 en tampón de bloqueo y a continuación se lavó 6x. La reacción cromática se realizó con 100 µl/pocillo de una solución de ABTS (ácido 2,2'-azino-di-(3 etilbenzotiazolinsulfónico) en tampón de ABTS, según las indicaciones del fabricante, con 0,1% (v/v) de una solución de peróxido de hidrógeno del 30%. Al cabo de unos 30 minutos se midió la absorción a 405 nm de longitud de onda (filtro de referencia: 595 nm). Los resultados de estos ensayos están representados en la figura 9.

Determinación de los títulos de IgE específicos de PLA2 en sueros de ratón

El ensayo ELISA de PLA2-IgE se realiza según el protocolo del ELISA para PLA2-IgG2a. Respecto al protocolo anteriormente descrito hay las siguientes diferencias: las placas de microvaloración se recubren con 5 µg/ml de un anticuerpo IgE anti-ratón. Después de incubar las muestras de suero y lavar las placas se incuba una dilución 1:333 de PLA2 marcado con biotina (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA). La formación del color con ABTS dura aproximadamente 1 h. Los resultados de estos ensayos están representados en la figura 9.

Leyendas de las figuras

Figura 1

Estructura teórica de moléculas MAT

La figura 1 muestra ejemplos de cómo pueden estar estructurados esquemáticamente los módulos individuales de una molécula MAT según la presente invención. En este contexto "Trans" representa un módulo de translocación, "Target" ("diana") representa un módulo de selección, "AG" representa un módulo de antígeno, "Tag" ("etiqueta") representa un módulo de etiqueta y un guion (-) representa un módulo de enlace. El módulo de enlace puede unir los otros módulos entre sí mediante enlaces covalentes y/o no covalentes. La figura 1A representa varios ejemplos de configuración lineal de los distintos módulos. La figura 1B representa varios ejemplos de moléculas MAT ramificadas, incluyendo también estructuras dendrimeras, y la figura 1C muestra algunos ejemplos de moléculas MAT circulares, en las cuales puede haber configuraciones circulares combinadas con configuraciones ramificadas y/o lineales. En general todas las configuraciones representadas son solo ejemplos para ilustrar que son posibles las estructuras más variadas. Los ejemplos de moléculas MAT representadas esquemáticamente no deben considerarse en ningún caso limitadoras del ámbito de protección de la presente invención.

Figura 2

Expresión, purificación y detección de proteínas de fusión

Se expresaron en *E. coli* diferentes moléculas MAT constituidas por un módulo de etiqueta (His6-Tag), un módulo de translocación (secuencia Tat), un módulo de selección de diana (cadena invariante de la MHC II humana) y un módulo de antígeno (Asp f1 = antígeno 1 de *Aspergillus fumigatus*) y se aislaron en condiciones desnaturalizantes mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados. Las etapas de trabajo se efectuaron según las indicaciones del fabricante del sistema de expresión (Qiagen, Hilden, Alemania) [47, 48]. 10 µg o 5 µg de las proteínas aisladas se separaron respectivamente por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y después se tiñeron con azul Coomassie (figura 2A) o bien se analizaron por Western blot usando anticuerpos que reconocen el módulo de etiqueta (figura 2B). Las posiciones de las proteínas expresadas están señaladas con flechas.

Figura 3

Translocación de proteínas y moléculas MAT dependiente de la temperatura

Se incubaron células mononucleares periféricas humanas primarias (PBMC) durante 5 minutos a 4, 22 o 37°C con las respectivas proteínas o moléculas MAT a una concentración de 1 µM, se lavaron, se recogieron en tampón de muestra que contenía urea y se lisaron. A continuación los lisados se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, se electrotransferieron a membranas de PVDF y las proteínas o moléculas MAT se detectaron con un anticuerpo específico (anticuerpo anti-RGS(His)4). Las flechas indican la posición de las proteínas o moléculas MAT. A todas las temperaturas se pudieron detectar las proteínas de fusión en los lisados celulares, lo cual demuestra una translocación efectiva hacia el interior de la célula.

Figura 4

Translocación de moléculas MAT a líneas celulares y células primarias

El resultado representado en la figura 4 se obtuvo prácticamente con la misma metodología que en el ensayo de la figura 3, pero con dos variaciones: la figura 4 muestra que tanto en las células humanas primarias (PBMC) como en las líneas de células tumorales humanas (células Jurkat) tuvo lugar con éxito la translocación de las moléculas MAT. Las flechas señalan en el Western blot la posición en la cual se detectó la proteína o la molécula MAT. Además las figuras 4A y 4B muestran que los distintos módulos de antígeno (Asp f1 = alérgeno de *Aspergillus fumigatus*, Der p1 = alérgeno de ácaros de polvo doméstico, Bet v1 = alérgeno del polen de abedul) pudieron llegar por translocación a las células PBMC humanas primarias.

Figura 5

Cinética de translocación de las moléculas MAT en función de la dosis

El resultado representado en la figura 5 se obtuvo prácticamente con la misma metodología que en el ensayo de la figura 3, empleando sin embargo tres o cuatro concentraciones diferentes de proteínas o moléculas MAT (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM y 5 mM). Se pudo demostrar que la reacción de translocación dependía claramente de la dosis. A mayor concentración de moléculas MAT añadidas se detectaron cantidades mayores de la respectiva molécula en el interior de la célula. Las posiciones de cada una de las moléculas están señaladas con flechas.

Figura 6

Diferentes estructuras funcionales de moléculas MAT

El resultado representado en la figura 6 se obtuvo prácticamente con la misma metodología que en el ensayo de la figura 3, pero estudiando tres disposiciones distintas del módulo de translocación (secuencia Tat) y del módulo de antígeno (Asp f1 = alérgeno de *Aspergillus fumigatus*). En la figura 6A la flecha indica la posición en la cual se detectó la proteína de fusión en el análisis Western blot. En la figura 6B se representa la estructura de las tres proteínas de fusión diferentes. Se ensayaron proteínas de fusión con módulo de translocación N-terminal, C-terminal invertido y C-terminal. Las tres proteínas de fusión se transportaron eficazmente por translocación al interior de la célula.

Figura 7

Proliferación in vitro de células PBMC de sujetos alérgicos mediada por antígenos/moléculas MAT

En la figura 7 se representan ensayos de células PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de sujetos alérgicos junto con una molécula MAT in vitro. La molécula MAT contenía como módulo de antígeno el alérgeno respectivo contra el que reacciona alérgicamente el paciente. Una presentación de antígeno más eficiente por parte de las células del sujeto alérgico presentadoras de antígenos, debida a la adición de la molécula MAT, estimula el crecimiento de las células PBMC. La proliferación celular resultante se cuantificó (eje y) por la incorporación de componentes de ADN marcados radiactivamente (timidina). El eje x indica la concentración en nM de molécula de antígeno o molécula MAT usada en la correspondiente prueba de estimulación celular. En todos los pacientes sometidos al ensayo con todos los módulos de antígeno estudiados (como parte de la molécula MAT), el uso de moléculas MAT a concentraciones menores produce una proliferación celular (= inestímulo = aumento de la incorporación de timidina = aumento de la radiactividad). Como control se usaron respectivamente las mismas células PBMC tratadas solo con agua que no contenía ni moléculas MAT ni antígenos (= control en la leyenda). Asimismo, como control positivo para cada ensayo se midió la incorporación de timidina a las células tratadas con un fuerte estímulo de crecimiento (0,5 µg/ml de cada uno de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28) durante 5 días. El crecimiento obtenido mediante este estímulo constituye un control de la calidad de las PBMC preparadas en cuanto a su capacidad de proliferación. Para el ensayo de la figura 7A se obtuvo un valor de 77864 ± 5347 cpm, para el ensayo de la figura 7B se obtuvo un valor de 100374 ± 11678 cpm y para los ensayos de las figuras 7C y D se obtuvo un valor de 112205 ± 5958 cpm.

Las figuras 7A hasta 7G demuestran para todos los 7 antígenos ensayados que la incorporación del antígeno en el módulo de antígeno de una molécula MAT inicia una proliferación de células PBMC del sujeto alérgico, incluso a concentraciones menores. Se probaron los antígenos Der p 1 (alérgeno de ácaros de polvo doméstico, fig. 7A), Bet v1 (alérgeno del polen de abedul, fig. 7B), Asp f 1 (alérgeno 1 de *Aspergillus fumigatus*, fig. 7C), Asp f 6 (alérgeno 6 de *Aspergillus fumigatus*, fig. 7D), Asp f 3 (alérgeno 3 de *Aspergillus fumigatus*, fig. 7E), PLA2 (alérgeno fosfolipasa A2 de veneno de abeja, fig. 7F) y Fel d 1 (*Felis domesticus*, fig. 7G). Además la figura 7H muestra para el antígeno Bet v 1 que en 4 pacientes distintos (I. hasta IV.) con alergia a Bet v 1, el empleo de moléculas MAT con Bet v 1 en el módulo de antígeno produce en todos ellos una proliferación de células PBMC a concentraciones menores que en el caso de usar Bet v 1 como antígeno.

Figura 8

Secreción de citocinas in vitro por células PBMC de sujetos alérgicos mediada por antígenos/moléculas MAT

5 Las figuras 8A y 8B muestran que para dos pacientes distintos alérgicos a Bet v 1, las células PBMC cultivadas in vitro y estimuladas con el antígeno Bet v 1 (solo o como módulo de una molécula MAT) presentan un patrón definido de secreción de citocinas. En I. se muestra respectivamente el resultado de un ensayo de proliferación (como en la fig. 7), en II. se muestran los valores de interferón gamma (INFg), en III. los valores de interleucina-10 (IL-10) y en IV. los valores de interleucina-5 (IL-5) en los sobrenadantes del cultivo celular. En una estimulación de células PBMC de efecto desensibilizante la proliferación de PBMC y un incremento de la liberación de INFg debería tener lugar ya a dosis de antígeno menores. Además la producción de IL-5 debería ser baja. Este patrón de secreción de citocinas indica una desensibilización de los inmunocitos de los sujetos alérgicos (respuesta inmunitaria Th1 en vez de Th2). El aumento de la concentración de IL-10 explica por qué la proliferación celular (fig. I) disminuye a mayores dosis de antígeno. Este patrón de secreción de citocinas aparece en ambos casos (figuras 8A y 8B).

Figura 9

Respuesta inmunitaria in vivo de ratones mediada por antígenos/moléculas MAT

20 Se inmunizaron ratones CBA/2 con PLA2 aislado, con moléculas MAT que llevaban PLA2 en el módulo de antígeno o con tampón de control 3x a intervalos de 2 semanas y a continuación se midieron los títulos en suero de los anticuerpos IgG2a y IgE específicos de PLA2. En caso de desensibilización solo debería aparecer IgG específico de PLA2, pero ningún anticuerpo IgE específico de PLA2. Los anticuerpos IgE son responsables de las reacciones alérgicas. Se estudiaron 3 vías de inmunización distintas, subcutánea, intraperitoneal e intranodal de inyección de los antígenos. Por las tres vías de inmunización se comprueba que una inmunización con PLA2 produce una clara respuesta inmunitaria de IgE (alergia) (fig. 9, columna izquierda). En cambio una inmunización con una molécula MAT que contiene PLA2 en el módulo de antígeno no produce ninguna respuesta inmunitaria de IgE (ausencia de alergia). Por otra parte, una inmunización tanto con PLA2 como con moléculas MAT que llevan PLA2 en el módulo de antígeno produce una deseada respuesta inmunitaria de IgG que no desencadena reacciones alérgicas.

30 En la presente solicitud de patente todos los ejemplos y enumeraciones están pensados básicamente para aclarar los hechos, pero no para limitar las reivindicaciones. En concreto los ejemplos de módulos de translocación, módulos de selección de dianas, módulos de antígeno, módulos espaciadores y módulos de etiqueta deben entenderse solo como ejemplos y no como una lista exhaustiva de todos los posibles componentes de la molécula MAT. La idea básica de la presente invención no consiste solo en una combinación determinada de módulos de translocación, módulos de selección de dianas y módulos de antígeno, sino más bien en una combinación de al menos estos tres módulos en una molécula MAT para usarla en inmunizaciones. Por tanto el ejemplo especialmente utilizado para cada uno de los módulos no tiene ninguna influencia en el concepto de la presente invención, pues según ella también se pueden usar otros ejemplos, incluso desconocidos actualmente, de los respectivos módulos.

40 En caso de que en este documento de patente no esté bien definido un término, o que el especialista del respectivo sector no lo conociera o que un término del contexto no pueda definirse claramente, se consideran válidas las definiciones de cada uno de los términos mencionadas en las siguientes obras de referencia. Si un término aparece con diferentes definiciones en varias de las obras citadas a continuación, entonces se considera válida la definición mencionada en la primera de dichas obras de la siguiente lista. A tal fin se enumeran las siguientes publicaciones:

- The Merck Manual [49]
- Molecular Cloning - A Laboratory Manual [43]
- Current Protocols in Immunology [44]
- Current Protocols in Protein Science [50]
- Current Protocols in Pharmacology [51]
- Current Protocols in Cell Biology [52]

Referencias de la literatura

- 55 1. Pieters, J. 2000. MHC class II-restricted antigen processing and presentation [*Procesamiento y presentación restringida de antígenos por MHC clase II*]. Adv Immunol. 75:159-208.
- 60 2. Marks, M.S., P.A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P.J. Peters, and J.S. Bonifacio. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments [*Una señal lisosomal de selección de diana en la cola citoplasmática de la cadena beta dirige HLA-DM a compartimentos de MHC clase II*]. J Cell Biol. 131:351-69.
- 65 3. Karlsson, K., and S.R. Carlsson. 1998. Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network [*Distribución de las glicoproteínas de membrana lisosomal lamp-1 y lamp-2 a vesículas distintas de las vesículas con receptor de manosa 6-fosfato/gamma-adaptina en la red trans-Golgi*]. J Biol Chem. 273:18966-73.

4. Obermüller, S., C. Kiecke, K. von Figura, and S. Honing. 2002. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes [*Los motivos de tirosina de Lamp 1 y LAP determinan su transporte selectivo directo e indirecto a los lisosomas*]. *J Cell Sci* 115:185-94.
5. Chervonsky, A.V., L. Gordon, and A.J. Sant. 1994. A segment of the MHC class II beta chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway [*Un segmento de la cadena beta de MHC clase II juega un papel crítico en la dirección selectiva de las moléculas de clase II al camino endocítico*]. *Int Immunol* 6:973-82.
6. Frankel, A., C. Pabo, J.G. Barsoum, S.E. Fawell, and R.B. Pepinsky. 1995. Tat-derived transport polypeptides and fusions proteins [*Polipéptidos de transporte y proteínas de fusión derivadas de Tat*]. US-Patent 5, 804, 604.
10. Prochiantz, A. 2000. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others [*Proteínas mensajeras: homeoproteínas, TAT y otras*]. *Curr Opin Cell Biol* 12:400-6.
8. Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, and Y. Sugiura. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery [*Péptidos ricos en arginina. Una fuente abundante de péptidos permeables de membrana que tienen potencial como portadores para la transmisión intracelular de proteínas*]. *J Biol Chem* 276:5836-40.
15. Schwartz, J.J., and S. Zhang. 2000. Peptide-mediated cellular delivery [*Transmisión celular mediada por péptidos*]. *Curr Opin Mol Ther* 2:162-7.
10. Wender, P.A., D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, and J.B. Rothbard. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters [*Diseño, síntesis y evaluación de moléculas que permiten o intensifican la absorción celular: transportadores moleculares peptóideos*]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13003-8.
11. Dorange, F., S. El Mehdaoui, C. Pichon, P. Coursaget, and J.F. Vautherot. 2000. Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16 [*Virus de la enfermedad de Marek (MDV) homólogos de los genes del virus del herpes simple tipo 1 UL49 (VP22) y UL48 (VP16): expresión de alto nivel y caracterización de VP22 y VP16 de MDV-1*]. *J Gen Virol* 81:2219-30.
25. Banerjee-Basu, S., D.W. Sink, and A.D. Baxevanis. 2001. The Homeodomain Resource: sequences, structures, DNA binding sites and genomic information [*El recurso del homeodominio: secuencias, estructuras, sitios de unión de ADN e información genómica*]. *Nucleic Acids Res* 29:291-3.
30. Park, J., J. Ryu, K.A. Kim, H.J. Lee, J.H. Bahn, K. Han, E.Y. Choi, K.S. Lee, H.Y. Kwon, and S.Y. Choi. 2002. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells [*Análisis mutacional de un dominio transductor de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, necesario para transmitir una proteína exógena a células de mamíferos*]. *J Gen Virol* 83:1173-81.
35. Rothbard, J.B., and P.A. Wender. 2001. Compositions and methods for enhancing drug delivery across biological membranes and tissues [*Composiciones y métodos para intensificar la transmisión de fármacos a través de membranas biológicas y tejidos*]. In US patent US 09779693.
15. Florkiewicz, R.Z., and A. Baird. 1998. US 6083706: Inhibitors of leaderless protein export [*Inhibidores de la exportación de proteínas sin secuencia señal*]. In US patent US 6083706. Ciblex Corporation (San Diego, CA).
40. Anderson, D.C., C.A. Morgan, A. P.G., E.J. Nichols, and A.R. Fritzberg. 1988. Covalently-linked complexes and methods for enhanced cytotoxicity and imaging [*Complejos de unión covalente y métodos de intensificación de la citotoxicidad y escaneo*]. In European patent EP 0359347. Neorx corporation.
17. Schwarze, S.R., and S.F. Dowdy. 2000. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA [*Transducción de proteínas in vivo: transmisión intracelular de proteínas, compuestos y ADN biológicamente activos*]. *Trends Pharmacol Sci* 21:45-8.
45. Schwarze, S.R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S.F. Dowdy. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [*Transducción de proteínas in vivo: transmisión de una proteína biológicamente activa en el ratón*]. *Science* 285:1569-72.
19. Zhong, G., P. Romagnoli, and R.N. Germain. 1997. Related leucinebased cytoplasmic targeting signals in invariant chain and major histocompatibility complex class II molecules control endocytic presentation of distinct determinants in a single protein [*Las señales afines de selección de diana citoplasmática a base de leucina en la cadena invariante y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II controlan la presentación endocítica de distintos determinantes en una proteína simple*]. *J Exp Med* 185:429-38.
50. Escola, J.M., M.J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J.M. Griffith, O. Yoshie, and H.J. Geuze. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B lymphocytes [*Enriquecimiento selectivo de proteínas tetraspan en las vesículas internas de endosomas multivesiculares y en exosomas secretados por linfocitos B humanos*]. *J Biol Chem* 273:20121-7.
21. August, T.J., D.M. Pardoll, and F.G. Guarnieri. 1993. Lysosomal targeting of immunogens [*Selección lisosomal de dianas inmunógenas*]. In US patent US 5633234. The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.
60. Sugita, M., R.M. Jackman, E. van Donselaar, S.M. Behar, R.A. Rogers, P.J. Peters, M.B. Brenner, and S.A. Porcelli. 1996. Cytoplasmic tail dependent localization of CD1 b antigen-presenting molecules to MHCs [*Localización dependiente de la cola citoplasmática en los MHC de moléculas presentadoras del antígeno CD1 b*]. *Science* 273:349-52.

23. Pieters, J., O. Bakke, and B. Dobberstein. 1993. The MHC class II associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail [*La cadena invariante asociada al MHC clase II contiene dos señales endosomales de selección de diana en su cola citoplasmática*]. *J Cell Sci.* 106:831-46.
24. Kornfeld, S., and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes [*La biogénesis de los lisosomas*]. *Annu Rev Cell Biol.* 5:483-525.
25. Schluesener, H.J. 1996. Protection against experimental nervous system autoimmune diseases by a human immunodeficiency virus-1 Tat peptide-based polyvalent vaccine [*Protección contra enfermedades autoinmunes del sistema nervioso experimental mediante una vacuna polivalente basada en el péptido Tat del virus 1 de la inmunodeficiencia humana*]. *J Neurosci Res.* 46:258-62.
26. Larsen, J.N., and H. Lowenstein. 2000. Official list of allergens, IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee [*Lista oficial de alérgenos, subcomité de nomenclatura de alérgenos de la IUIS*]. <ftp://biobase.dk/pub/who-iuis/allergen.list>.
27. Larsen, J.N., and H. Lowenstein. 2001. List of isoallergens and variants, IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee [*Lista de isoalérgenos y variantes, subcomité de nomenclatura de alérgenos de la IUIS*]. <ftp://biobase.dk/pub/who-iuis/isoallergen.list>.
28. Xenarios, I., L. Salwinski, X.J. Duan, P. Higney, S.M. Kim, and D. Eisenberg. 2002. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions [*DIP, la base de datos de proteínas interactuantes: una herramienta para estudiar las redes celulares de las proteínas interactuantes*]. *Nucleic Acids Res.* 30:303-5.
29. Barrett, A.J., J.D. Rawlings, and J.F. Woessner. 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes [*Manual de enzimas proteolíticas*]. Academic Press, ISBN 0-12-079371-7.
30. Rawlings, N.D., E. O'Brien, and A.J. Barrett. 2002. MEROPS: the protease database [*MEROPS: la base de datos de proteasas*]. *Nucleic Acids Res.* 30:343-6.
31. Vlahovicek, K., J. Murvai, E. Barta, and S. Pongor. 2002. The SBASE protein domain library, release 9.0: an online resource for protein domain identification [*La biblioteca SBASE de dominios proteicos, edición 9.0: un recurso en línea para identificar dominios proteicos*]. *Nucleic Acids Res.* 30:273-5.
32. Sheldon, K., D. Liu, J. Ferguson, and J. Garipey. 1995. Lolligomers: design of de novo peptide-based intracellular vehicles [*Loligómeros: diseño de vehículos intracelulares basados en nuevos péptidos*]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2056-60.
33. Dawson, P.E., and S.B. Kent. 2000. Synthesis of native proteins by chemical ligation [*Síntesis de proteínas naturales por ligación química*]. *Annu Rev Biochem.* 69:923-60.
34. Yan, L.Z., and P.E. Dawson. 2001. Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization [*Síntesis de péptidos y proteínas sin restos de cisteína por ligación química natural combinada con desulfuración*]. *J Am Chem Soc.* 123:526-33.
35. Garavelli, J.S., Z. Hou, N. Pattabiraman, and R.M. Stephens. 2001. The RESID Database of protein structure modifications and the NRL-3D Sequence-Structure Database [*La base de datos RESID de modificaciones de estructuras proteicas y la base de datos de estructuras secuenciales NRL-3D*]. *Nucleic Acids Res.* 29:199-201.
36. Hruby, V.J., J.M. Ahn, and S. Liao. 1997. Synthesis of oligopeptide and peptidomimetic libraries [*Síntesis de bibliotecas de oligopéptidos y peptidomiméticos*]. *Curr Opin Chem Biol.* 1:114-9.
37. Senderowitz, H., and R. Rosenfeld. 2001. Design of structural combinatorial libraries that mimic biologic motifs [*Diseño de bibliotecas de combinaciones estructurales que imitan motivos biológicos*]. *J Recept Signal Transduct Res.* 21:489-506.
38. Sulyok, G.A., C. Gibson, S.L. Goodman, G. Holzemann, M. Wiesner, and H. Kessler. 2001. Solid-phase synthesis of a nonpeptide RGD mimetic library: new selective alphavbeta3 integrin antagonists [*Síntesis en fase sólida de una biblioteca mimética de RGD no peptídico: nuevos antagonistas selectivos de integrina alfavbeta3*]. *J Med Chem.* 44:1938-50.
39. Invitrogen. VoyagerTM NES Protein Produktion Kits: Rapid cloning and expression of VP22 fusion proteins in *E. coli* for translocation of purified recombinant protein into the cytoplasm of mammalian cells [*Kits de producción de proteínas VoyagerTM NES: clonación y expresión rápida de proteínas de fusión VP22 en E. coli para la translocación de proteína recombinante purificada en el citoplasma de células de mamífero*]. Invitrogen life technologies. Version C 050302 25-0377.
40. Goodman, M., A. Felix, L. Moroder, and C. Toniolo. 2002. Houben-Weyl: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics [*Síntesis de péptidos y peptidomiméticos*]. Thieme Medical and Scientific Publishers. Vol. 22.
41. Hover, J.E. 1975. Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co., Easton, PA, USA.
42. Libermann, H.A., and L. Lachman. 1980. Pharmaceutical Dosage Forms. Marcel Decker Inc., New York, NY, USA.
43. Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 3rd Edition.
44. Coligan, J.E., A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, and (Editors). 2002. Current Protocols in Immunology. John Wiley & Son, Inc., Hoboken, NJ, USA.
45. Moser, M., R. Cramer, G. Menz, T. Schneider, T. Dudler, C. Virchow, M. Gmachl, K. Blaser, and M. Suter. 1992. Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity [*Clonación y expresión del alérgeno recombinante I/a (rAsp f I/a) de Aspergillus fumigatus con fijación de IgE y actividad de prueba cutánea tipo 1*]. *J Immunol.* 149:454-60.
46. Mayer, C., S. Hemmann, A. Faith, K. Blaser, and R. Cramer. 1997. Cloning, production, characterization and IgE cross-reactivity of different manganese superoxide dismutases in individuals sensitized to *Aspergillus*

fumigatus [*Clonación, producción, caracterización y reactividad cruzada con IgE de diferentes dismutasas de superóxido de manganeso en individuos sensibilizados a Aspergillus fumigatus*]. Int Arch Allergy Immunol. 113:213-5.

5 47. Qiagen. 2001. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins [*Manual de alto nivel de expresión y purificación de proteínas marcadas con 6xHis*]. Qiagen GmbH, Hilden, Germany. Fifth Edition: 1-128.

48. Qiagen. 2001. QIAexpress Detection and Assay Handbook. Qiagen GmbH, Hilden Germany. Third Edition:1-100.

10 49. Beers, M.H., R. Berkow, and (Editors). 1999. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Merck Research Laboratories, Whitehous Station, NJ, USA. 17th Edition.

50. Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher, P.T. Wingfield, and (Editors). 2002. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Son, Inc., Hoboken, NJ, USA.

51. Enna, S.J., M. Williams, J.W. Ferkany, T. Kenakin, R.D. Porsolt, J.P. Sullivan, and (Editors). 2002. Current Protocols in Pharmacology. John Wiley & Son, Inc., Hoboken, NJ, USA.

15 52. Bonifacino, J.S., M. Dasso, J. Lippincott-Schwartz, J.B. Harford, K.M. Yamada, and (Editors). 2002. Current Protocols in Cell Biology. John Wiley & Son, Inc., Hoboken, NJ, USA.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> BioVisioN AG
 <120> Moléculas modulares de transporte de antígenos (moléculas MAT) para modular reacciones inmunitarias
 <130> MAT
 <150> EP02022774.0
 <151> 2002-10-11
 25 <160> 20
 <170> Patente In versión 3.1
 <210> 1
 <211> 870
 <212> ADN
 30 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Aspergillus fumigatus
 <400> 1

ES 2 542 329 T3

atgagaggat cgcatacaca tcacatcac ggatctggtt acggtcgtaa aaagcgtcgc 60
cagcgtcgcc gtggatctat ggatgaccag cacgacctta tctccaacaa tgagcaactg 120
cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac 180
acaggctttt ccatcctggt gactctgctc ctgctggcc aggccaccac cgctacttc 240
ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa ctgacagtca cctcccagaa cttgcagctg 300
gagaacctgc gcatgaaact tcccaagcct cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc 360
accccgtgc tgatgcaggc gctgcccatt ggagccctgc ccaggggac tagtggatcc 420
gcgacctgga catgcatcaa ccaacagctg aatcccaaga caaacaatg ggaagacaag 480
cggcttctat acagtcaagc caaagccgaa agcaactccc accacgcacc tctttccgac 540
ggcaagaccg gtagcagcta cccgactgg ttactaacg gctacgacgg gaatggcaag 600
ctcatcaagg gtcgcacgcc catcaaattc ggaaaagccg actgtgaccg tccccgaag 660
cgcagccaga acggcatggg caaggatgac cactacctgc tggagtccc gacttttcca 720
gatggccacg actataagtt tgactcgaag aaaccaagg aagaccggg cccagcgagg 780
gtcatctata cttatcccaa caaggtgttt tgcggcattg tggcccatca gcgggggaat 840
cagggagact tgagactgtg ttctcattag 870

<210> 2

<211> 289

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Aspergillus fumigatus

<400> 2

5

ES 2 542 329 T3

Cys Ile Asn Gln Gln Leu Asn Pro Lys Thr Asn Lys Trp Glu Asp Lys
 145 150 155 160

Arg Leu Leu Tyr Ser Gln Ala Lys Ala Glu Ser Asn Ser His His Ala
 165 170 175

Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr Pro His Trp Phe Thr
 180 185 190

Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Gly Lys Leu Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile
 195 200 205

Lys Phe Gly Lys Ala Asp Cys Asp Arg Pro Pro Lys Arg Ser Gln Asn
 210 215 220

Gly Met Gly Lys Asp Asp His Tyr Leu Leu Glu Phe Pro Thr Phe Pro
 225 230 235 240

Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys Pro Lys Glu Asp Pro
 245 250 255

Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn Lys Val Phe Cys Gly
 260 265 270

Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn Gln Gly Asp Leu Arg Leu Cys Ser
 275 280 285

His

<210> 3

<211> 1044

<212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Aspergillus fumigatus

<400> 3

5

ES 2 542 329 T3

atgagaggat cgcatacaca tcaccatcac ggatctgggtt acggtcgtaa aaagcgtcgc 60
 cagcgtcgcg gtggatctat ggatgaccag cacgacctta tctccaacaa tgagcaactg 120
 cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg gagagcaagt gcagccgagg agccctgtac 180
 acaggctttt ccatcctggg gactctgctc ctcgctggcc aggccaccac cgcctacttc 240
 ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa ctgacagtca cctcccagaa cttgcagctg 300
 gagaacctgc gcatgaaact tccaagcct cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc 360
 accccgctgc tgatgcaggc gctgcccatt ggagccctgc cccaggggac tagtggatct 420
 caatacacgc tcccaccctt ccctacccc tacgatgcc tccaacccta catctcccaa 480
 cagatcatgg agctgcacca caaaaagcac catcaaacct acgtcaatgg cctgaatgcc 540
 gactcggagg cgcagaagaa agcggcgga gccaccgacg tccccagct cgtctccgtg 600
 cagcaagcga tcaaatcaa cggcgggggg cacatcaacc attccctctt ctggaagaat 660
 ctggccccgg agaaatccgg ggggtggcaag atcgatcagg caccggctct caaagcagcc 720
 atcgagcagc gttggggatc cttegataag ttcaaggatg ctttcaacac gaccctgctg 780
 ggcatcagg gcagcggatg gggttgggta gtgaccgacg gaccaaggg aaagctagac 840
 attaccacaa cccacgacca ggatccgggtg accggggcgg ccccgtctt tggggtggat 900
 atgtgggagc atgcttacta ccttcagtac ttgaacgaca aagcctcgta tgccaagggc 960
 atctggaacg tgatcaactg ggctgaagcg gagaatcggg acatagcggg tgacaagggt 1020
 ggacacccat tcatgaagct gtag 1044

<210> 4

<211> 347

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Aspergillus fumigatus

<400> 4

ES 2 542 329 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Tyr Gly Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser Met Asp Asp Gln His Asp
 20 25 30

Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met Leu Gly Arg Arg Pro Gly
 35 40 45

Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser
 50 55 60

Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe
 65 70 75 80

Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr Ser Gln
 85 90 95

Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Pro Pro Lys
 100 105 110

Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala Leu
 115 120 125

ES 2 542 329 T3

Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Thr Ser Gly Ser Gln Tyr Thr Leu
 130 135 140

Pro Pro Leu Pro Tyr Pro Tyr Asp Ala Leu Gln Pro Tyr Ile Ser Gln
 145 150 155 160

Gln Ile Met Glu Leu His His Lys Lys His His Gln Thr Tyr Val Asn
 165 170 175

Gly Leu Asn Ala Ala Leu Glu Ala Gln Lys Lys Ala Ala Glu Ala Thr
 180 185 190

Asp Val Pro Lys Leu Val Ser Val Gln Gln Ala Ile Lys Phe Asn Gly
 195 200 205

Gly Gly His Ile Asn His Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ala Pro Glu
 210 215 220

Lys Ser Gly Gly Gly Lys Ile Asp Gln Ala Pro Val Leu Lys Ala Ala
 225 230 235 240

Ile Glu Gln Arg Trp Gly Ser Phe Asp Lys Phe Lys Asp Ala Phe Asn
 245 250 255

Thr Thr Leu Leu Gly Ile Gln Gly Ser Gly Trp Gly Trp Leu Val Thr
 260 265 270

Asp Gly Pro Lys Gly Lys Leu Asp Ile Thr Thr Thr His Asp Gln Asp
 275 280 285

Pro Val Thr Gly Ala Ala Pro Val Phe Gly Val Asp Met Trp Glu His
 290 295 300

ES 2 542 329 T3

Ala Tyr Tyr Leu Gln Tyr Leu Asn Asp Lys Ala Ser Tyr Ala Lys Gly
 305 310 315 320

Ile Trp Asn Val Ile Asn Trp Ala Glu Ala Glu Asn Arg Tyr Ile Ala
 325 330 335

Gly Asp Lys Gly Gly His Pro Phe Met Lys Leu
 340 345

<210> 5

<211> 903

5 <212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Betula verrucosa

<400> 5

atgagaggat cgcattacca tcaccatcac ggatctggtt acggtcgtaa aaagcgtcgc 60
 cagcgtcggc gtggatctat ggatgaccag cacgacctta tctccaacaa tgagcaactg 120
 cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg gagagcaagt gcagccggcg agccctgtac 180
 acaggctttt ccatcctggg gactctgctc ctgctggcc aggccaccac cgctacttc 240
 ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa ctgacagtca cctcccagaa cttgcagctg 300
 gagaacctgc gcatgaaact tccaagcct cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc 360
 accccgctgc tgatgcaggc gctgcccctg ggagccctgc ccagggggac tagtggatcc 420
 atgggtgttt tcaactacga aaccgaaacc acctccgcta tcccggctgc tcgtctgttc 480
 aaggccttca tcctggacgg tgacaacctg ttcctaagg ttgctccgca ggctatctcc 540
 tccgttgaaa acatcgaagg taacgggtggc ccgggtacca tcaagaaaat ctcttcccg 600
 gaaggtttcc catttaaata cgtaaaagac cgtgttgacg aagttgacca caccaacttc 660

10

ES 2 542 329 T3

```

aaatacaact actccgttat cgaaggtggt ccaattggtg acaccctgga aaaaatctcc      720
aacgaaatca aaatcgtggc aaccccggac ggtggttcca tccttaagat ctccaacaaa      780
taccacacca aaggtgacca cgaagttaaa gctgaacagg ttaaagcttc gaaagaaatg      840
ggtgaaaccc tgctgctgtc tgttgaatcc tacctgctgg ctcaactccga tgcatacaac      900
taa                                                                              903

```

<210> 6

<211> 300

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Betula verrucosa

<400> 6

```

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Tyr Gly Arg
1           5           10           15

```

```

Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser Met Asp Asp Gln His Asp
          20           25           30

```

```

Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met Leu Gly Arg Arg Pro Gly
          35           40           45

```

```

Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser
          50           55           60

```

```

Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe
65           70           75           80

```

10

ES 2 542 329 T3

Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr Ser Gln
 85 90 95

Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Pro Pro Lys
 100 105 110

Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala Leu
 115 120 125

Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Thr Ser Gly Ser Met Gly Val Phe
 130 135 140

Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Leu Phe
 145 150 155 160

Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys Val Ala Pro
 165 170 175

Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly Gly Pro Gly
 180 185 190

Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe Lys Tyr Val
 195 200 205

Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys Tyr Asn Tyr
 210 215 220

Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu Lys Ile Ser
 225 230 235 240

Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser Ile Leu Lys
 245 250 255

ES 2 542 329 T3

Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val Lys Ala Glu
 260 265 270

Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val
 275 280 285

Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
 290 295 300

<210> 7

<211> 1089

5 <212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Dermatophagoides
 pteronyssinus

<400> 7

atgagaggat cgcacaccca tcaccatcac ggatctgggt acggtcgtaa aaagcgtcgc 60

cagcgtcgcc gtggatctat ggatgaccag cacgacctta tctccaacaa tgagcaactg 120

cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac 180

acaggctttt ccatcctggt gactctgctc ctgctggcc aggccaccac cgcctacttc 240

ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa ctgacagtca cctcccagaa cttgcagctg 300

gagaacctgc gcatgaaact tccaagcct cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc 360

accccgtgct tgatgcaggc gctgcccatt ggagccctgc cccaggggac tagtggatcc 420

actaacgcat gtagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa tcgatttgcg acaaatgcga 480

actgtcactc ccattcgtat gcaaggagge tgtggttcat gttgggcttt ctctggtggt 540

10 gccgcaactg aatcagctta tttggctcac cgtaatcaat cattggatct tgctgaacaa 600

ES 2 542 329 T3

gaattagtcg attgtgcttc ccaacacggt tgtcatggtg ataccattcc acgtgggtatt 660
 gaatacatcc aacataatgg tgtcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa 720
 caatcatgcc gacgaccaa tgcaaacgt ttcgggtatct caaactattg ccaaatttac 780
 ccaccaaatg caaacaaaat tcgtgaagct ttggctcaaa cccacagcgc tattgccgtc 840
 attattggca tcaaagattt agacgcattc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa 900
 cgcgataatg gttaccaacc aactatcac gctgtcaaca ttgttgggta cagtaacgca 960
 caaggtgtcg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggt 1020
 tacggttatt ttgctgcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatgttgtc 1080
 attctctaa 1089

<210> 8

<211> 362

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana + Homo sapiens + Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 8

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Tyr Gly Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser Met Asp Asp Gln His Asp
 20 25 30

Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met Leu Gly Arg Arg Pro Gly
 35 40 45

10

ES 2 542 329 T3

Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser
 50 55 60

Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe
 65 70 75 80

Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr Ser Gln
 85 90 95

Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Pro Pro Lys
 100 105 110

Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala Leu
 115 120 125

Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Thr Ser Gly Ser Thr Asn Ala Cys
 130 135 140

Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg
 145 150 155 160

Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala
 165 170 175

Phe Ser Gly Gly Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg Asn
 180 185 190

Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln
 195 200 205

His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln
 210 215 220

ES 2 542 329 T3

His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu
 225 230 235 240

Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr
 245 250 255

Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala
 260 265 270

Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp
 275 280 285

Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly
 290 295 300

Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala
 305 310 315 320

Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp
 325 330 335

Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met
 340 345 350

Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 355 360

<210> 9
 <211> 39
 5 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 9
 ggttacggtc gtaaaaagcg tcgccagcgt cgccgtgga 39
 <210> 10
 10 <211> 13
 <212> PRT

ES 2 542 329 T3

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 10
 Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 429
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

5
 10
 atgagaggat cgcacacacca tcaccatcac ggatctgggtt acggtcgtaa aaagcgtcgc 60
 cagcgtcgcc gtggatctat ggatgaccag cacgacctta tctccaacaa tgagcaactg 120
 cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg gagagcaagt gcagccgagg agccctgtac 180
 acaggctttt ccatcctggg gactctgctc ctcgctggcc aggccaccac cgcctacttc 240
 ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa ctgacagtca cctcccagaa cttgcagctg 300
 gagaacctgc gcatgaaact tccaagcct cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc 360
 accccgctgc tgatgcagge gctgcccatt ggagccctgc cccagggggac tagtctgcag 420
 aagcttaat 429

15
 20
 <210> 12
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

ES 2 542 329 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Tyr Gly Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser Met Asp Asp Gln His Asp
 20 25 30

Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met Leu Gly Arg Arg Pro Gly
 35 40 45

Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser
 50 55 60

Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe
 65 70 75 80

Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr Ser Gln
 85 90 95

Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Pro Pro Lys
 100 105 110

Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala Leu
 115 120 125

Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Thr Ser Leu Gln Lys Leu Asn
 130 135 140

- 5 <210> 13
- <211> 450
- <212> ADN
- <213> Aspergillus fumigatus
- <400> 13

10

ES 2 542 329 T3

gcgacctgga catgcatcaa ccaacagctg aatcccaaga caaacaatg ggaagacaag 60
cggttctat acagtcaagc caaagccgaa agcaactccc accacgcacc tctttccgac 120
ggcaagaccg gtagcagcta cccgcactgg ttcactaacg gctacgacgg gaatggcaag 180
ctcatcaagg gtcgcacgcc catcaaattc ggaaaagccg actgtgaccg tccccgaag 240
cacagccaga acggcatggg caaggatgac cactacctgc tggagttccc gacttttcca 300
gatggccacg actataagtt tgactcgaag aaaccaagg aagacccggg cccagcgagg 360
gtcatctata cttatcccaa caaggtgttt tgcggcattg tggcccatca gcgggggaat 420
cagggagact tgagactgtg ttctcattag 450

<210> 14
<211> 149
<212> PRT
<213> *Aspergillus fumigatus*
<400> 14

5

ES 2 542 329 T3

Ala Thr Trp Thr Cys Ile Asn Gln Gln Leu Asn Pro Lys Thr Asn Lys
 1 5 10 15

Trp Glu Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Ser Gln Ala Lys Ala Glu Ser Asn
 20 25 30

Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr Pro
 35 40 45

His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Gly Lys Leu Ile Lys Gly
 50 55 60

Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ala Asp Cys Asp Arg Pro Pro Lys
 65 70 75 80

His Ser Gln Asn Gly Met Gly Lys Asp Asp His Tyr Leu Leu Glu Phe
 85 90 95

Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys Pro
 100 105 110

Lys Glu Asp Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn Lys
 115 120 125

Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn Gln Gly Asp Leu
 130 135 140

Arg Leu Cys Ser His
 145

- <210> 15
- <211> 633
- 5 <212> ADN
- <213> Aspergillus fumigatus
- <400> 15

ES 2 542 329 T3

atgtcacagc aatacacgct cccacccctc ccctaccctt acgatgcctt ccaaccctac 60
atctcccaac agatcatgga gctgcaccac aaaaagcacc atcaaacctt cgtcaatggc 120
ctgaatgccg cactcgaggc gcagaagaaa gggcggaag ccaccgacgt cccaagctc 180
gtctccgtgc agcaagcgat caaattcaac ggcggggggc acatcaacca ttccctcttc 240
tggaagaatc tggccccgga gaaatccggg ggtggcaaga tcgatcaggc accggtcctc 300
aaagcagcca tcgagcagcg ttggggatcc ttcgataagt tcaaggatgc tttcaacacg 360
accctgctgg gcattcaggg cagcggatgg ggttggttag tgaccgacgg acccaaggga 420
aagctagaca ttaccacaac ccacgaccag gatccggtga ccggggcggc ccccgctttt 480
ggggtggata tgtgggagca tgcttactac cttcagtact tgaacgacaa agcctcgtat 540
gccaaaggga tctggaacgt gatcaactgg gctgaagcgg agaatcggta catagcgggt 600
gacaaggggtg gacaccatt catgaagctg tag 633

<210> 16
<211> 210
<212> PRT
<213> *Aspergillus fumigatus*
<400> 16

5

ES 2 542 329 T3

Met Ser Gln Gln Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Pro Tyr Asp Ala
 1 5 10 15

Leu Gln Pro Tyr Ile Ser Gln Gln Ile Met Glu Leu His His Lys Lys
 20 25 30

His His Gln Thr Tyr Val Asn Gly Leu Asn Ala Ala Leu Glu Ala Gln
 35 40 45

Lys Lys Ala Ala Glu Ala Thr Asp Val Pro Lys Leu Val Ser Val Gln
 50 55 60

Gln Ala Ile Lys Phe Asn Gly Gly Gly His Ile Asn His Ser Leu Phe
 65 70 75 80

Trp Lys Asn Leu Ala Pro Glu Lys Ser Gly Gly Gly Lys Ile Asp Gln
 85 90 95

Ala Pro Val Leu Lys Ala Ala Ile Glu Gln Arg Trp Gly Ser Phe Asp
 100 105 110

Lys Phe Lys Asp Ala Phe Asn Thr Thr Leu Leu Gly Ile Gln Gly Ser
 115 120 125

Gly Trp Gly Trp Leu Val Thr Asp Gly Pro Lys Gly Lys Leu Asp Ile
 130 135 140

Thr Thr Thr His Asp Gln Asp Pro Val Thr Gly Ala Ala Pro Val Phe
 145 150 155 160

ES 2 542 329 T3

Gly Val Asp Met Trp Glu His Ala Tyr Tyr Leu Gln Tyr Leu Asn Asp
 165 170 175

Lys Ala Ser Tyr Ala Lys Gly Ile Trp Asn Val Ile Asn Trp Ala Glu
 180 185 190

Ala Glu Asn Arg Tyr Ile Ala Gly Asp Lys Gly Gly His Pro Phe Met
 195 200 205

Lys Leu
 210

<210> 17
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> Betula verrucosa
 <400> 17

5

atgagaggat cgcacaccca tcaccatcac ggatccatgg gtggtttcaa ctacgaaacc 60
 gaaaccacct ccgttatccc ggctgctcgt ctgttcaagg ccttcacacct ggacggtgac 120
 aacctgttcc ctaagggtgc tccgcagggt atctcctccg ttgaaaacat cgaaggtaac 180
 ggtggcccgg gtaccatcaa gaaaatctcc ttcccggaag gtttccatt taaatacgta 240
 aaagaccgtg ttgacgaagt tgaccacacc aacttcaaat acaactactc cgttatcgaa 300
 ggtggtccaa ttggtgacac cctggaaaaa atctccaacg aaatcaaaat cgtggcaacc 360
 ccggacggtg gttccatcct taagatctcc aacaaatacc acaccaaagg tgaccacgaa 420
 gttaaagctg aacagggttaa agcttcgaaa gaaatgggtg aaaccctgct gcgtgctggt 480
 gaatcctacc tgctgggtca ctccgatgca tacaactaa 519

10

<210> 18
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Betula verrucosa
 <400> 18

15

ES 2 542 329 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Met Gly Val Phe
 1 5 10 15

Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Leu Phe
 20 25 30

Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys Val Ala Pro
 35 40 45

Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly Gly Pro Gly
 50 55 60

Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe Lys Tyr Val
 65 70 75 80

Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys Tyr Asn Tyr
 85 90 95

Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu Lys Ile Ser
 100 105 110

Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser Ile Leu Lys
 115 120 125

Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val Lys Ala Glu
 130 135 140

Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val
 145 150 155 160

Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
 165 170

ES 2 542 329 T3

<210> 19
 <211> 1099
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 19

5

```

gaattccttt ttttttcttt ctctctctaa aatctaaaat ccatccaaca tgaaaattgt      60

tttggccatc gcctcattgt tggcattgag cgctgtttat gctcgtccat catcgatcaa      120

aacttttgaa gaatacaaaa aagccttcaa caaaagttat gctaccttcg aagatgaaga      180

agctgcccgt aaaaactttt tggaatcagt aaaatatggt caatcaaatg gaggtgccat      240

caaccatttg tccgatttgt cgttggatga attcaaaaaac cgatttttga tgagtgcaga      300

agcttttgaa cacctcaaaa ctcaattcga tttgaatgct gaaactaacg cctgcagtat      360

caatggaaat gctccagctg aaatcgattt gcgacaaatg cgaactgtca ctcccattcg      420

tatgcaagga ggctgtgggt catggtgggc tttctctggt gttgccgcaa ctgaatcagc      480

ttatttggtc taccgtaatc aatcattgga tcttgctgaa caagaattag tcgattgtgc      540

ttcccaacac ggttgatcatg gtgataccat tccacgtggt attgaataca tccaacataa      600

tgggtgctgc caagaaagct actatcgata cgttgcaaga gaacaatcat gccgacgacc      660

aatgcacaaa cgtttcggta tctcaaaacta ttgccaaatt taccaccaa atgtaaacia      720

aattcgtgaa gctttggctc aaaccacag cgctattgcc gtcattattg gcatcaaaga      780

tttagacgca ttcgctcatt atgatggccg aacaatcatt caacgcgata atggttacca      840

accaaactat cacgctgtca acattgttg ttacagtaac gcacaaggtg tcgattattg      900

gatcgtacga aacagttggg ataccaattg gggtgataat ggttacggtt attttgctgc      960

caacatcgat ttgatgatga ttgaagaata tccatattgt gtcattctct aaacaaaaag     1020

acaatttctt atatgattgt cactaattta tttaaaatca aaatttttag aaaatgaata     1080

aattcattca caaaaatta                                     1099
    
```


ES 2 542 329 T3

Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile
 50 55 60

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu
 65 70 75 80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn
 85 90 95

Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile
 100 105 110

Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly
 115 120 125

Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala
 130 135 140

Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu
 145 150 155 160

Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg
 165 170 175

Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr
 180 185 190

Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg
 195 200 205

Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys
 210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Uso de una molécula modular de transporte de antígenos (molécula MAT) - formada por al menos un módulo de translocación que promueve el transporte de la molécula MAT desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula, al menos un módulo de selección de dianas que promueve el transporte intracelular de la molécula MAT a los orgánulos involucrados en el procesamiento de antígenos o en la carga de moléculas MHC II con antígenos y al menos un módulo de antígeno que como mínimo es una unidad de la molécula que consta de un antígeno y que determina la especificidad de una respuesta inmunitaria en un sujeto modulada por la molécula MAT – para elaborar un medicamento destinado a la profilaxis o al tratamiento de una enfermedad infecciosa, de una enfermedad autoinmune, de una alergia, de una enfermedad reumática, de una reacción de rechazo a un órgano trasplantado y/ de una enfermedad maligna.
2. Uso según la reivindicación 1, en que el módulo de translocación es una secuencia de aminoácidos, el módulo de selección de dianas es una secuencia de aminoácidos y el módulo de antígeno es una proteína o un péptido.
3. Uso según una de las reivindicaciones 1 o 2, en que los módulos individuales están acoplados entre sí por enlaces covalentes.
4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en que la molécula MAT presenta una estructura lineal.
5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, en que la molécula MAT contiene hasta dos módulos de antígeno, hasta dos módulos de selección de dianas y hasta dos módulos de translocación.
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, en que al menos un módulo de translocación contiene como mínimo una de las siguientes secuencias o al menos una parte funcional de las mismas para el transporte de la molécula MAT desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula: VIH-Tat, Antennapedia, VP22, secuencias de poliarginina o polilisina de 4 hasta 20 aminoácidos de longitud o secuencias invertidas de las antes citadas.
7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en que al menos un módulo de selección de dianas contiene una de las siguientes secuencias o estructuras una parte funcional de estas secuencias: cadena invariante de MHC (IIP33, IIP4I, IIP35, IIP43), cadena beta de MHC II, receptor de manosa-6-fosfato, inmunoglobulina unida a membrana (mIg), cadena beta de HLA-DM, LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3, Limp 1, CD63, CA82, CD1b o secuencias invertidas de las antes citadas.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, en que al menos un módulo de antígeno es una proteína, un ácido nucleico, una estructura sacárida o un lípido.
9. Uso según la reivindicación 8, en que el antígeno se puede preparar por métodos combinatorios.
10. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, en que además hay al menos un módulo de etiqueta.
11. Uso según la reivindicación 10, en que al menos un módulo de etiqueta se elige del grupo formado por His-Tag con 4 hasta 6 restos consecutivos de histidina, Myc-Tag, FLAG-Tag, HA-Tag, Strep-Tag, Xpress-Tag, S-Tag, CBD-Tag, GST-Tag, HSV-Tag, T7-Tag, proteína A-Tag, V5-Tag, etiqueta fijadora de quitina, etiqueta fijadora de maltosa, etiqueta fijadora de calmodulina o un grupo de biotina.
12. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 11, en que los módulos están unidos entre sí mediante módulos espaciadores.
13. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 12 para la profilaxis o terapia de alergias.
14. Uso según la reivindicación 13, en que el módulo de antígeno es como mínimo un alérgeno elegido del grupo formado por Feld 1, Bet v 1, Bet v 2, Der p 1, PLA 2.
15. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, en que el medicamento contiene además, como mínimo, uno de los siguientes ingredientes y/u otras sustancias auxiliares y aditivos farmacéuticamente aceptables:
- una solución fisiológica de cloruro sódico
 - un adyuvante farmacéuticamente aceptable
 - una sustancia tampón farmacéuticamente aceptable
 - una proteína soporte farmacéuticamente aceptable
 - un conservante farmacéuticamente aceptable
 - un colorante farmacéuticamente aceptable
16. Uso de (i) una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de la molécula MAT según la reivindicación 1, ii) un vector que contiene al menos una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de una molécula MAT según una de

- las reivindicaciones anteriores, iii) una célula o línea celular primaria que contiene al menos un vector y/o una secuencia de ácidos nucleicos según i) o ii), o iv) exosomas, dexosomas o liposomas que contienen al menos una molécula MAT según una de las reivindicaciones 1 hasta 14, un ácido nucleico codificador de la misma o un vector que contiene este ácido nucleico, para elaborar un medicamento destinado a la profilaxis o al tratamiento de una enfermedad infecciosa, de una enfermedad autoinmune, de una alergia, de una enfermedad reumática, de una reacción de rechazo a un órgano trasplantado y/ de una enfermedad maligna.
- 5
17. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, en que el medicamento es una vacuna.
- 10
18. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el preparado inyectable está diseñado para inyectarlo en un nodo linfático o aplicarlo a través de las mucosas.

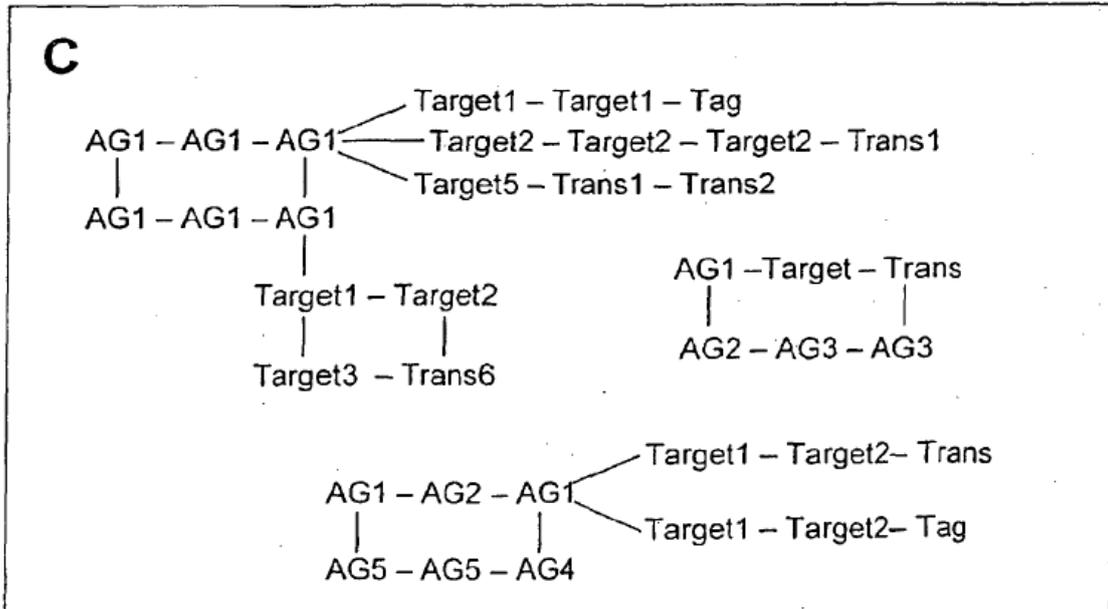
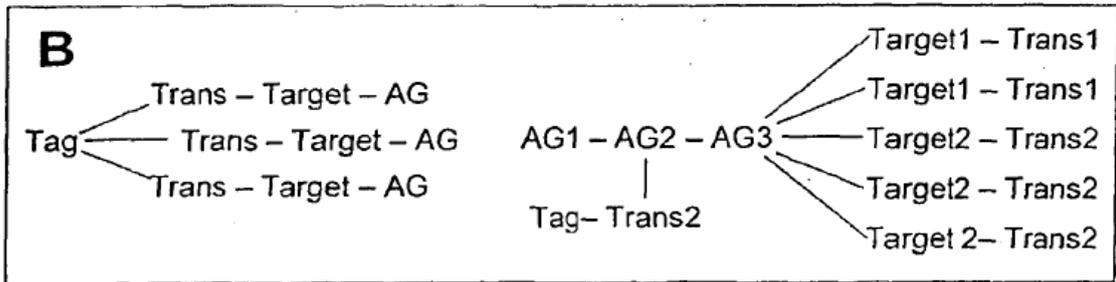
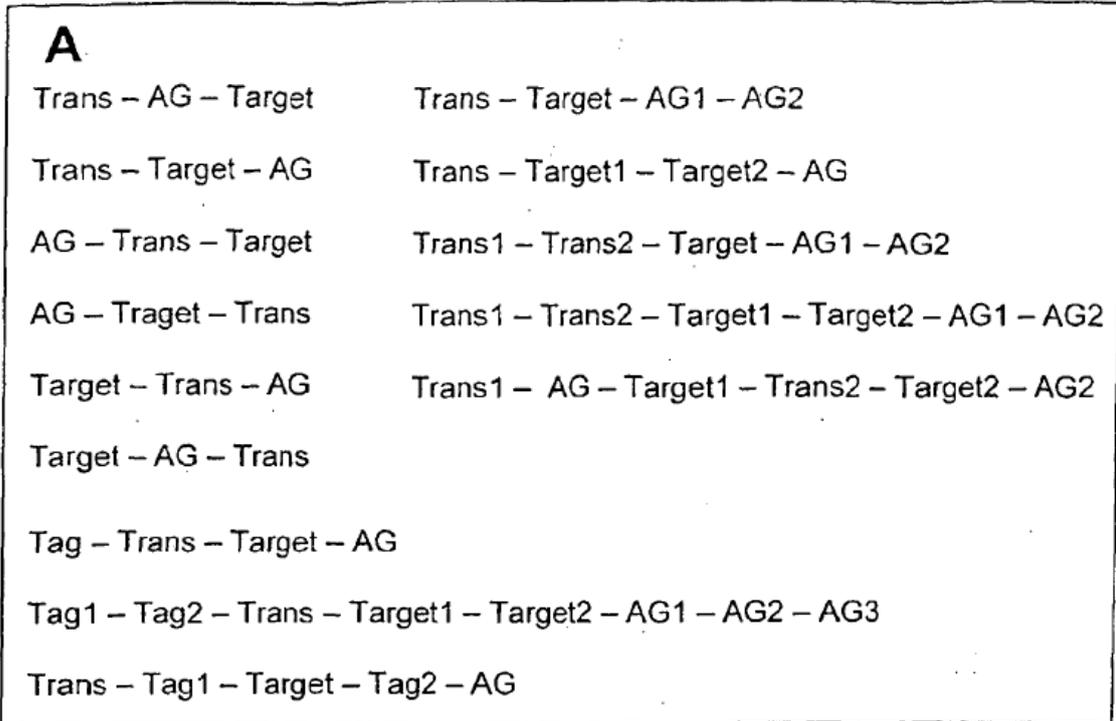


Figura 1

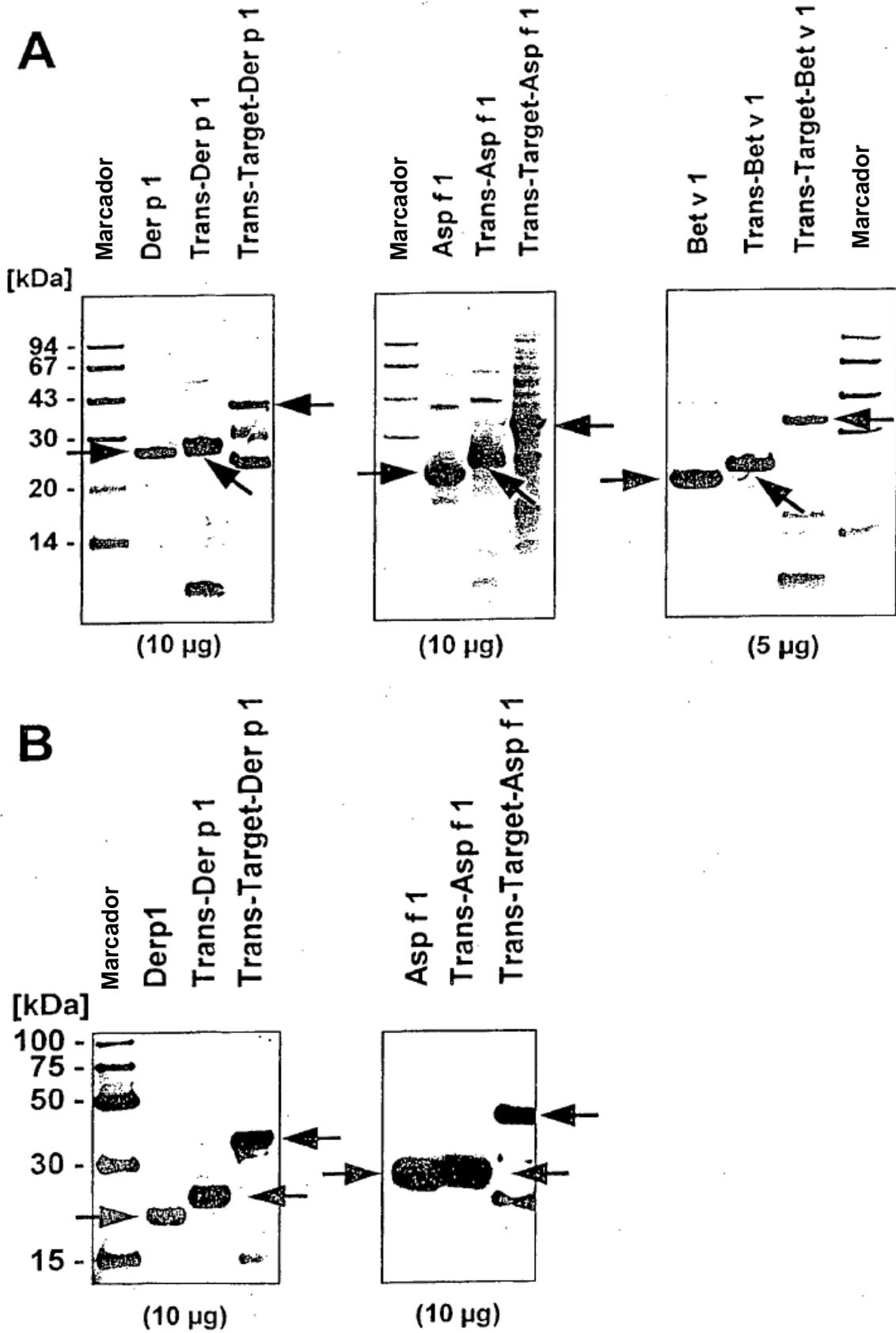


Figura 2

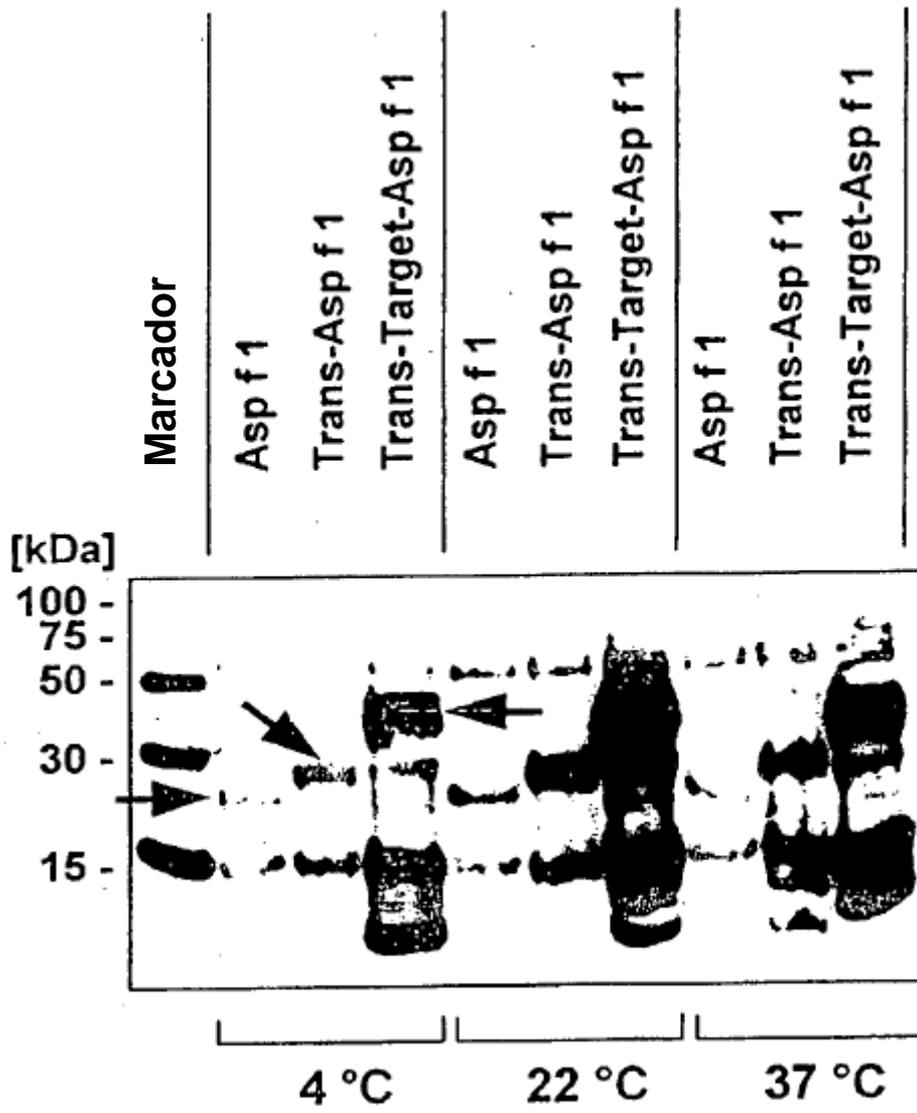


Figura 3

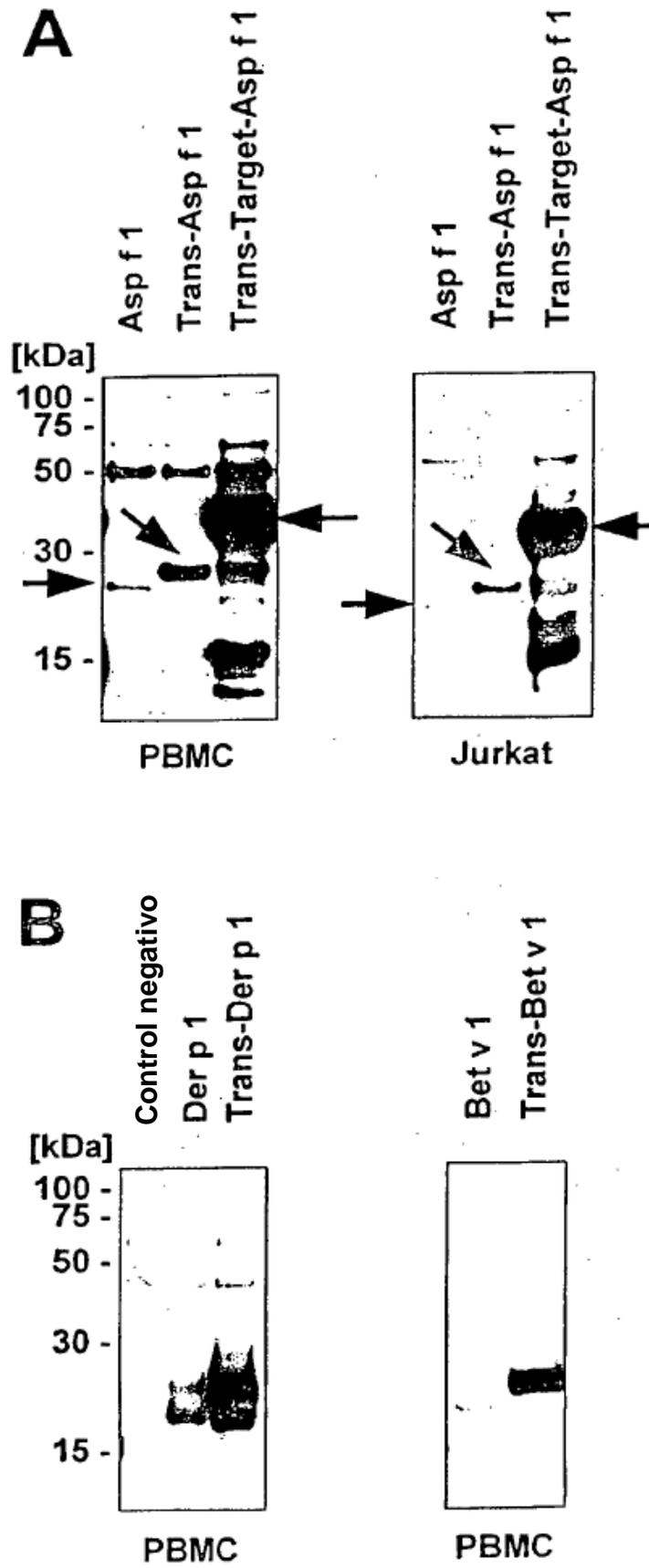


Figura 4

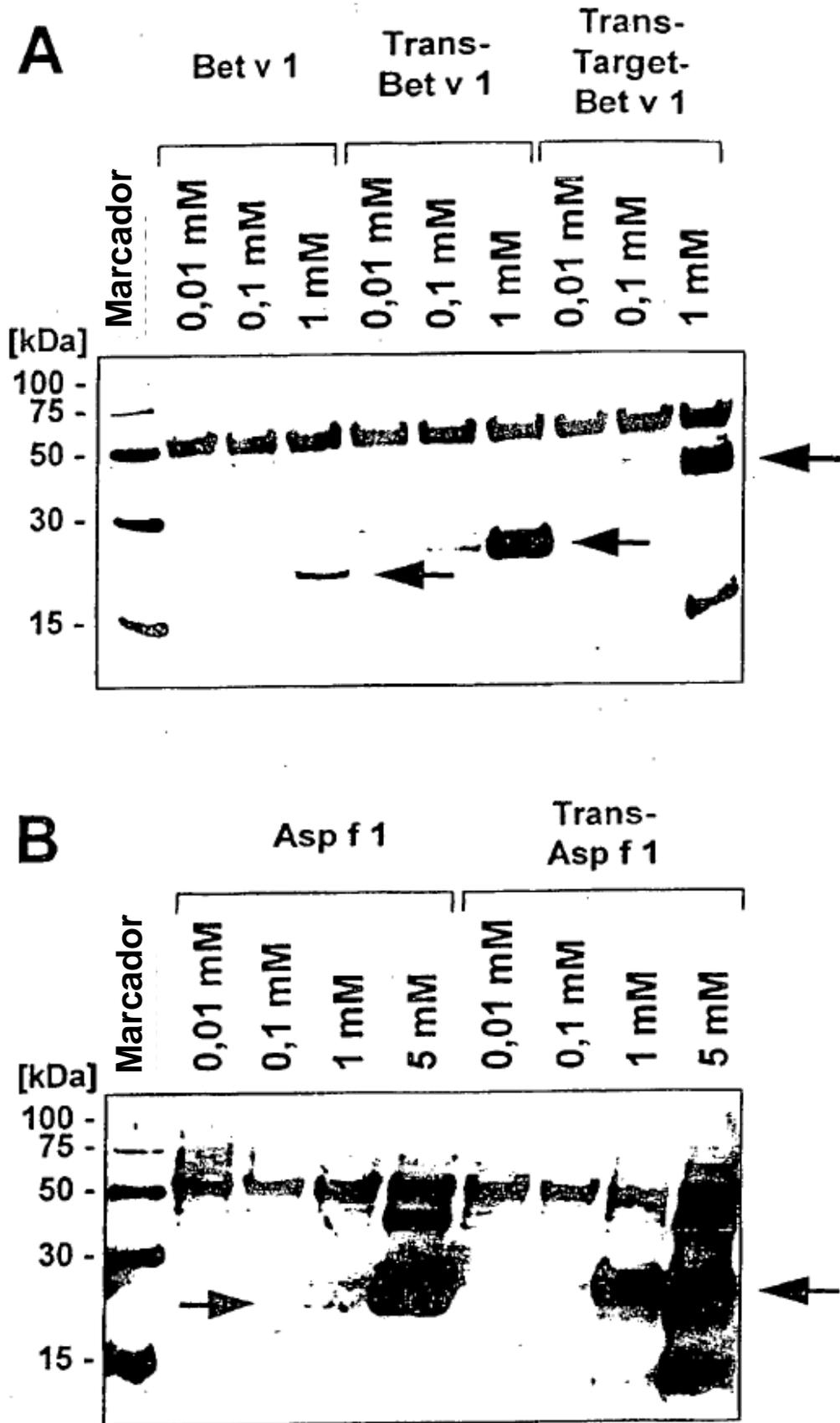


Figura 5

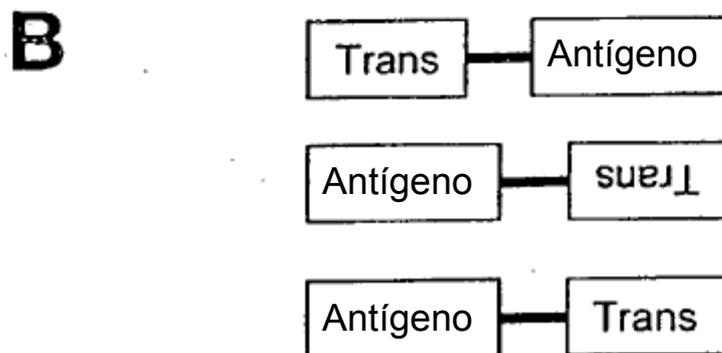
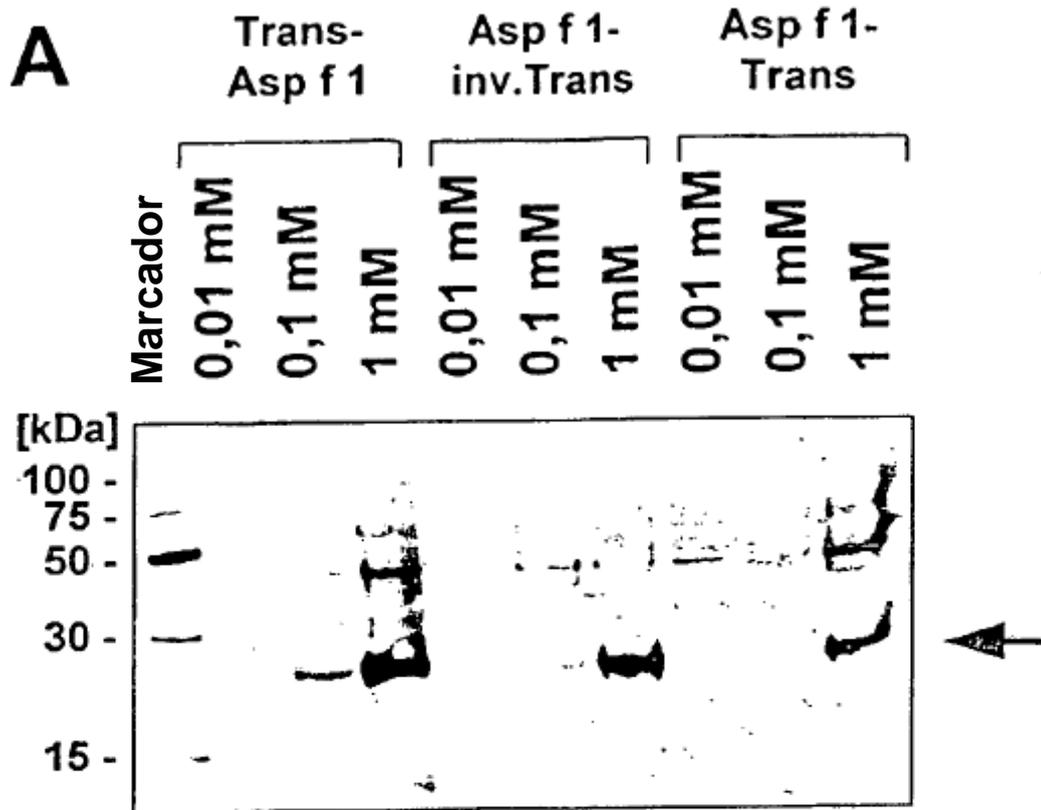
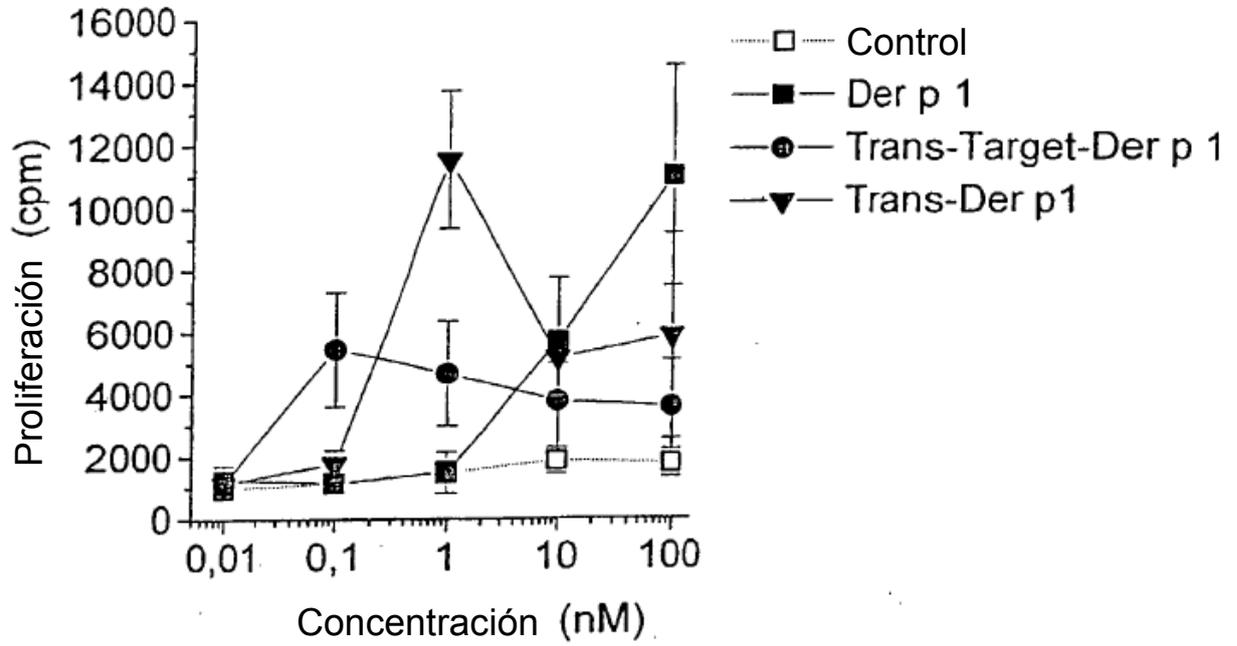


Figura 6

A



B

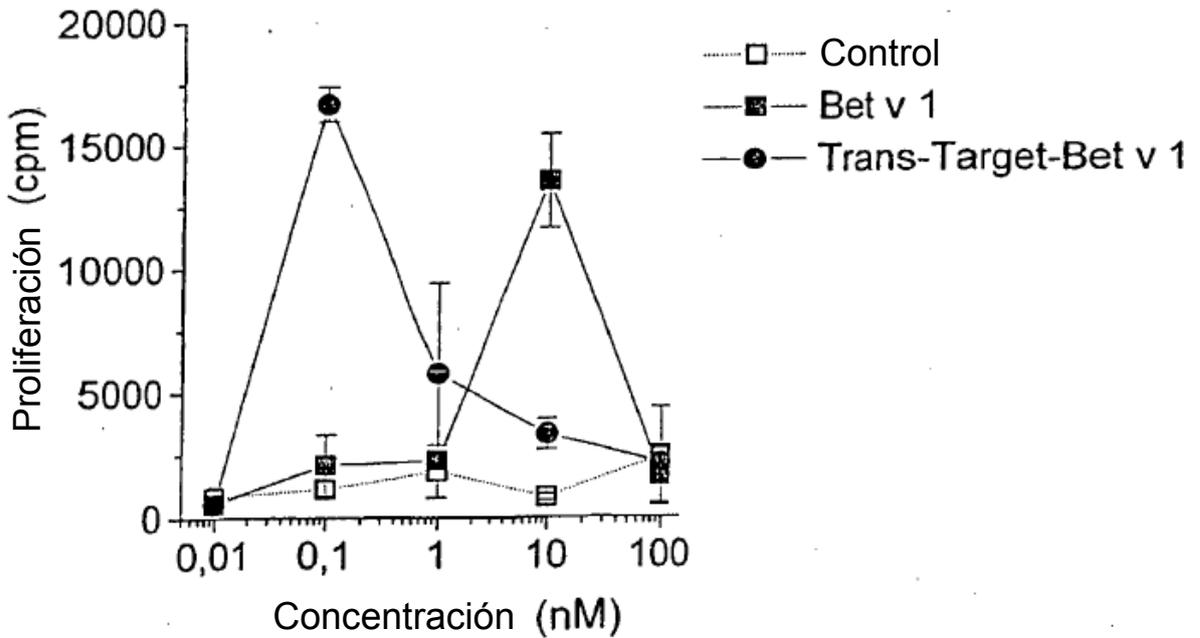
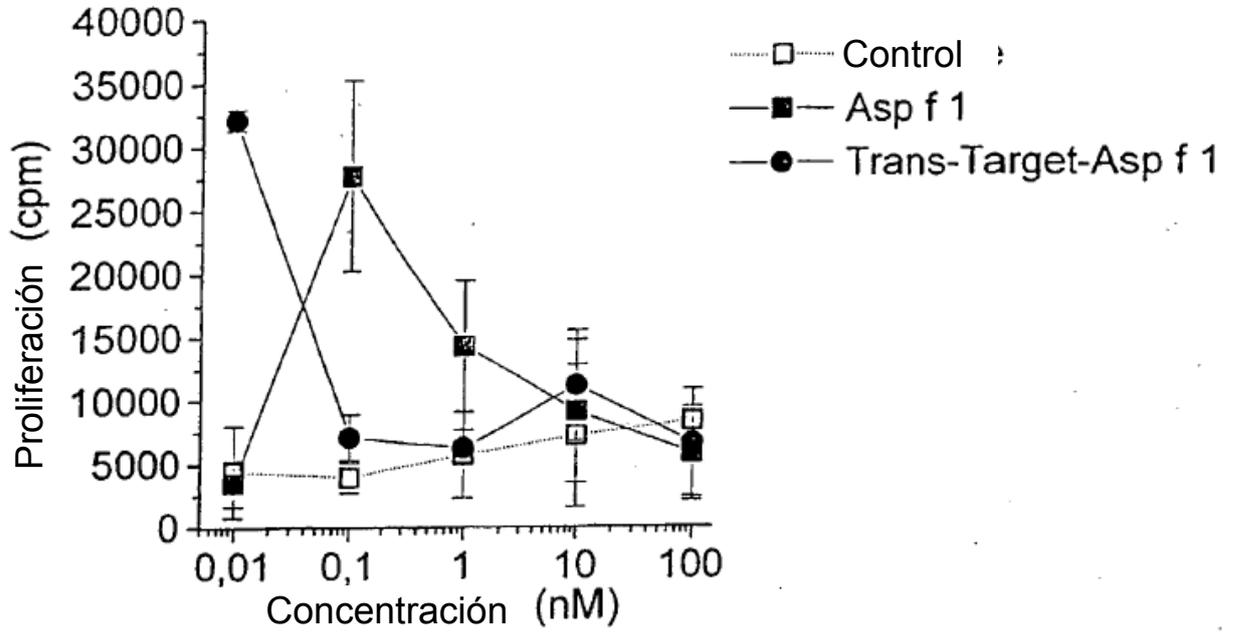


Figura 7 A - B

C



D

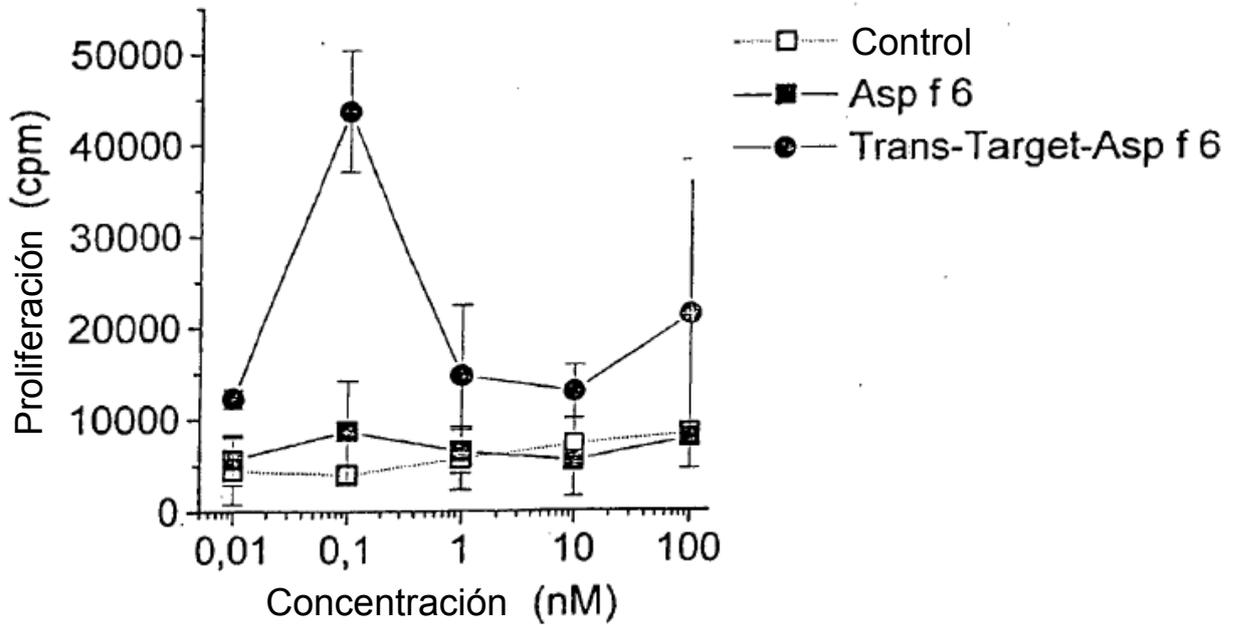


Figura 7 C - D

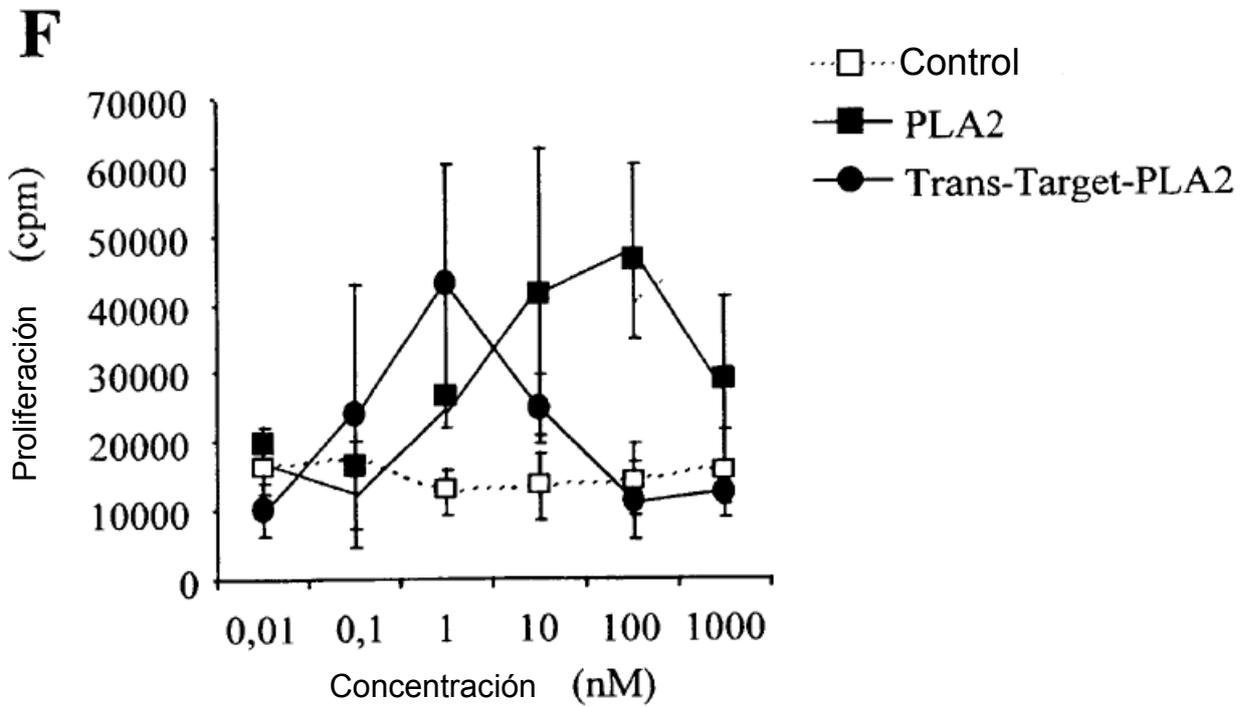
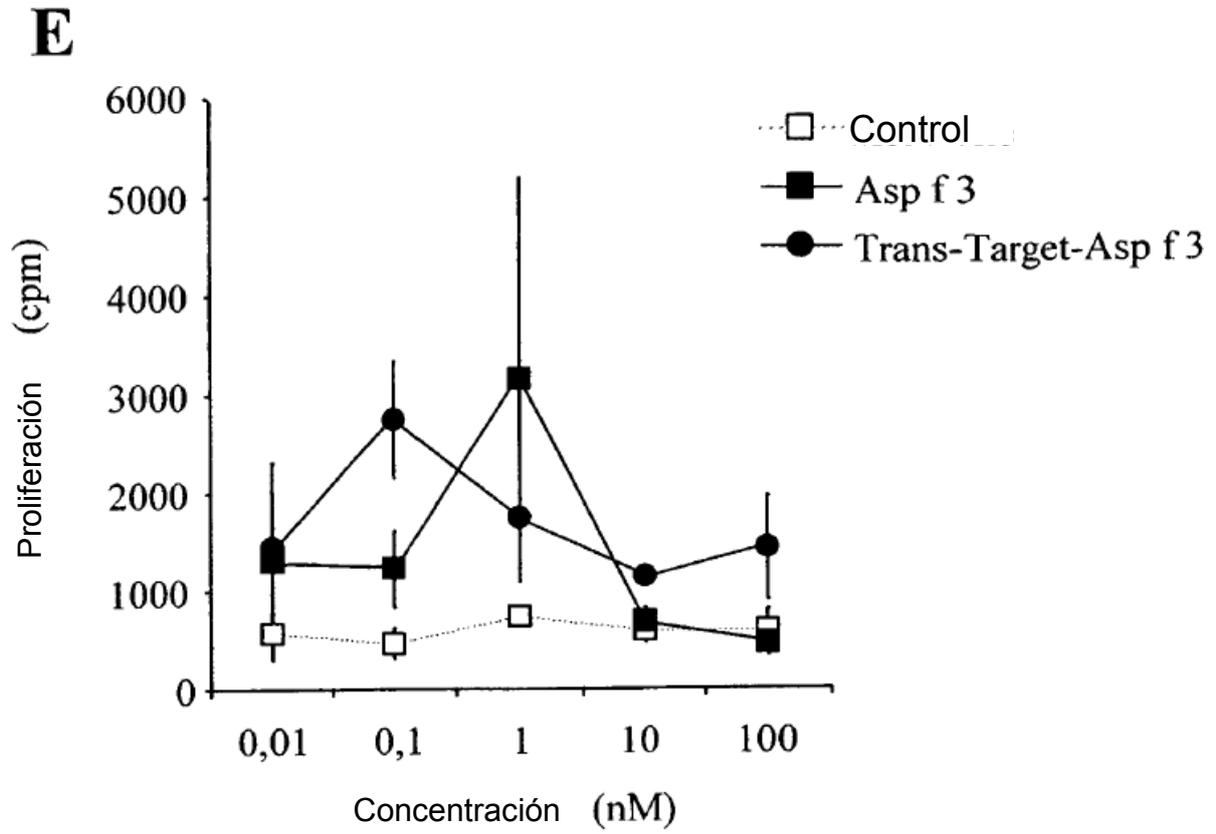


Figura 7 E - F

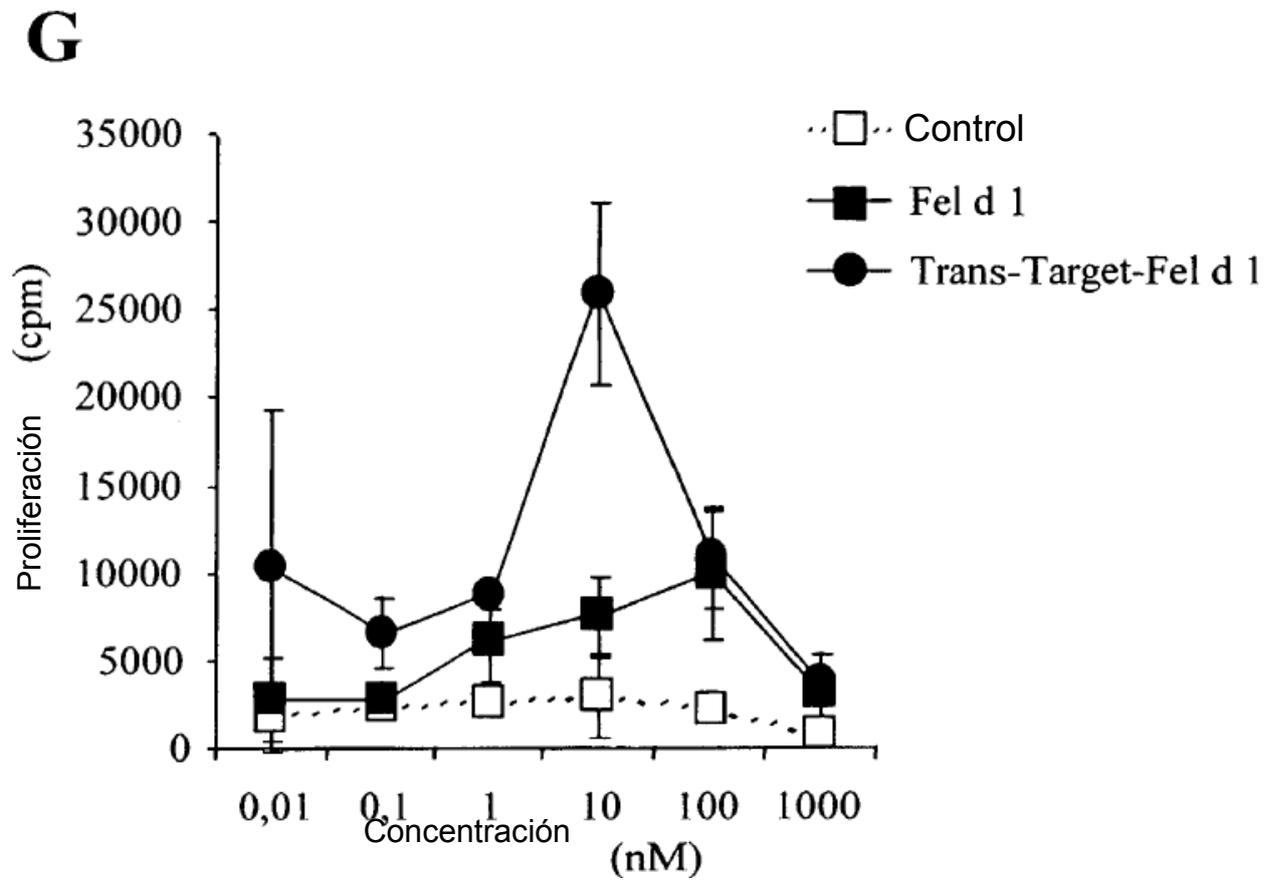


Figura 7G

H

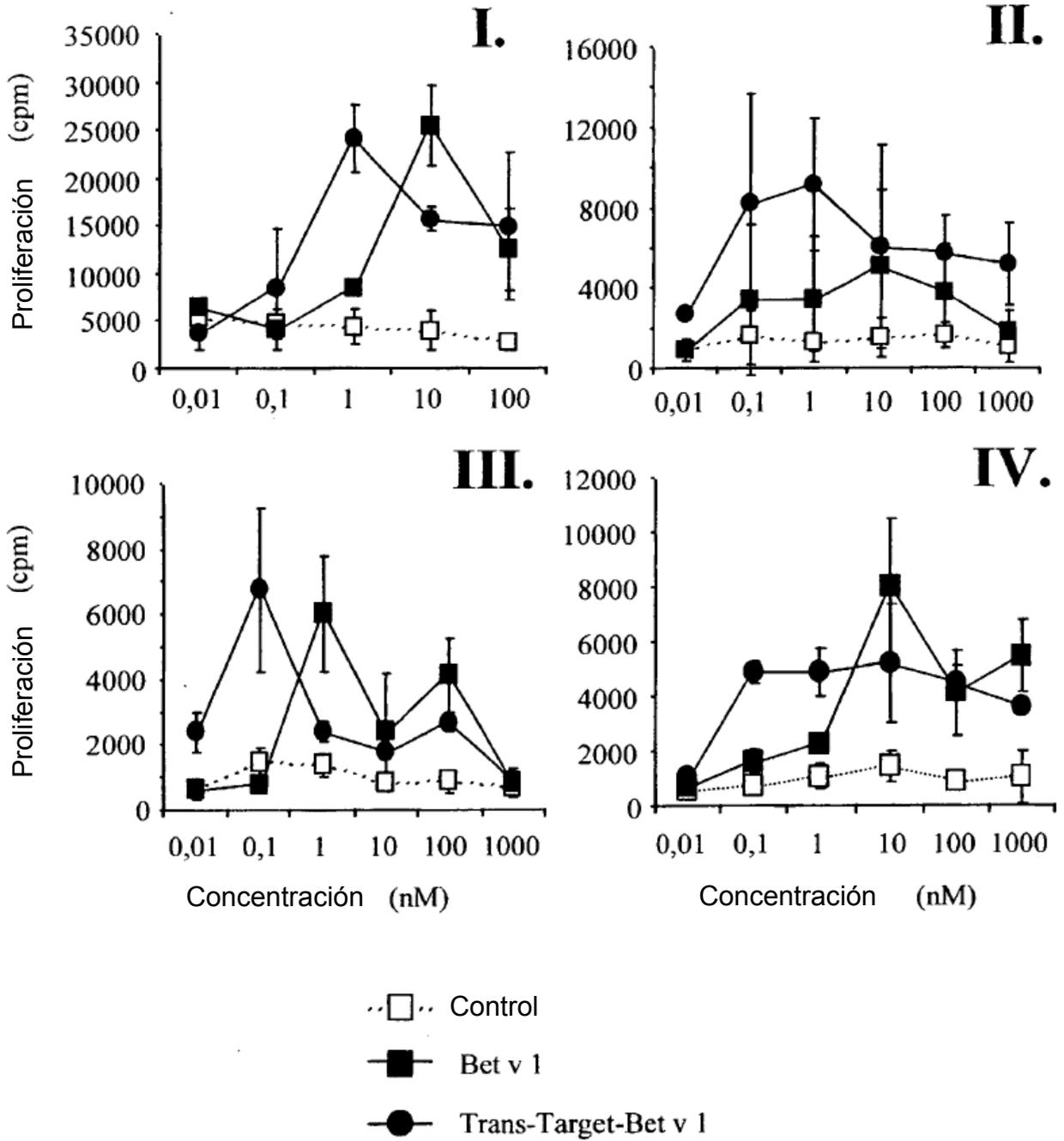


Figura 7H

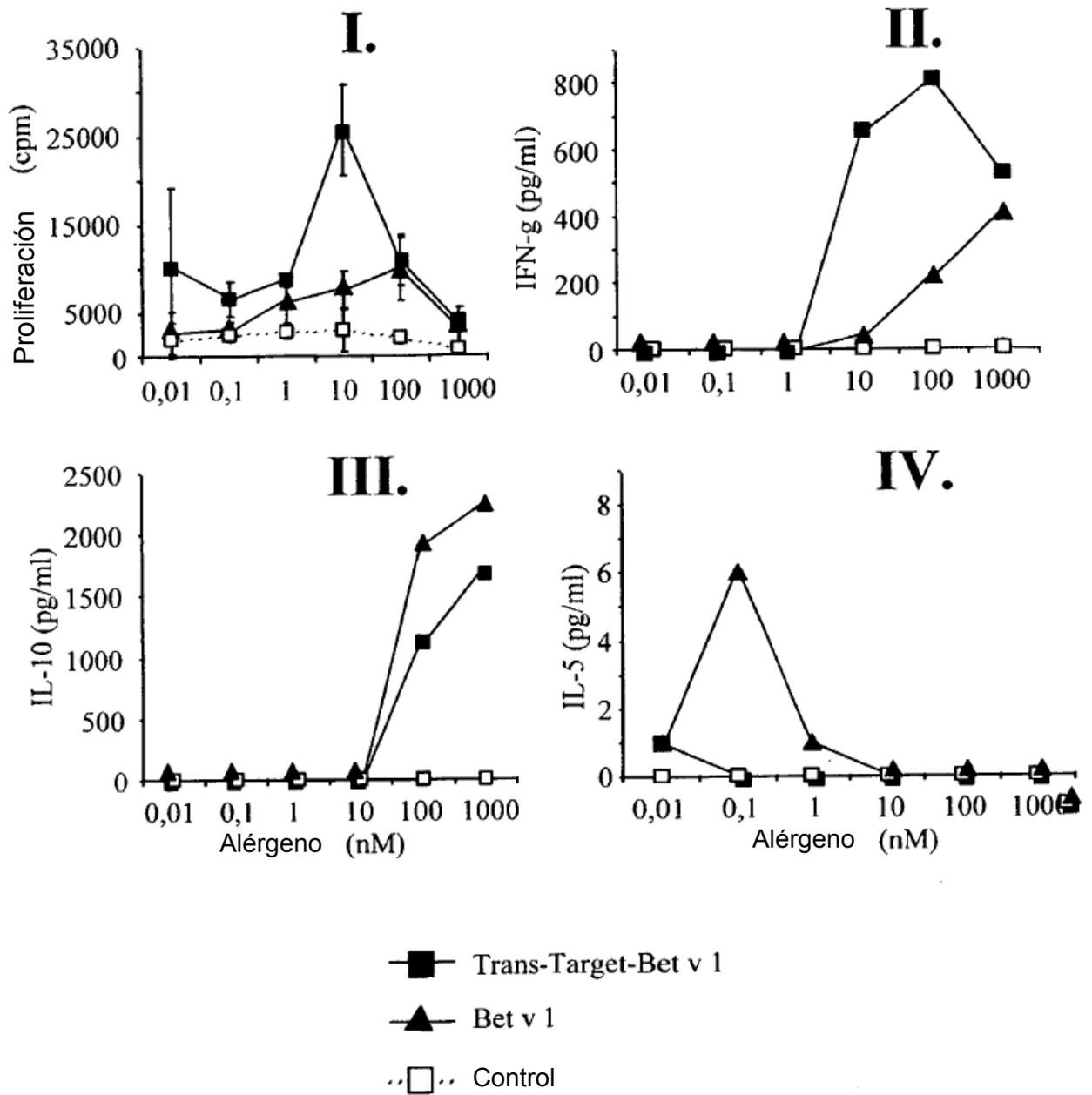


Figura 8A

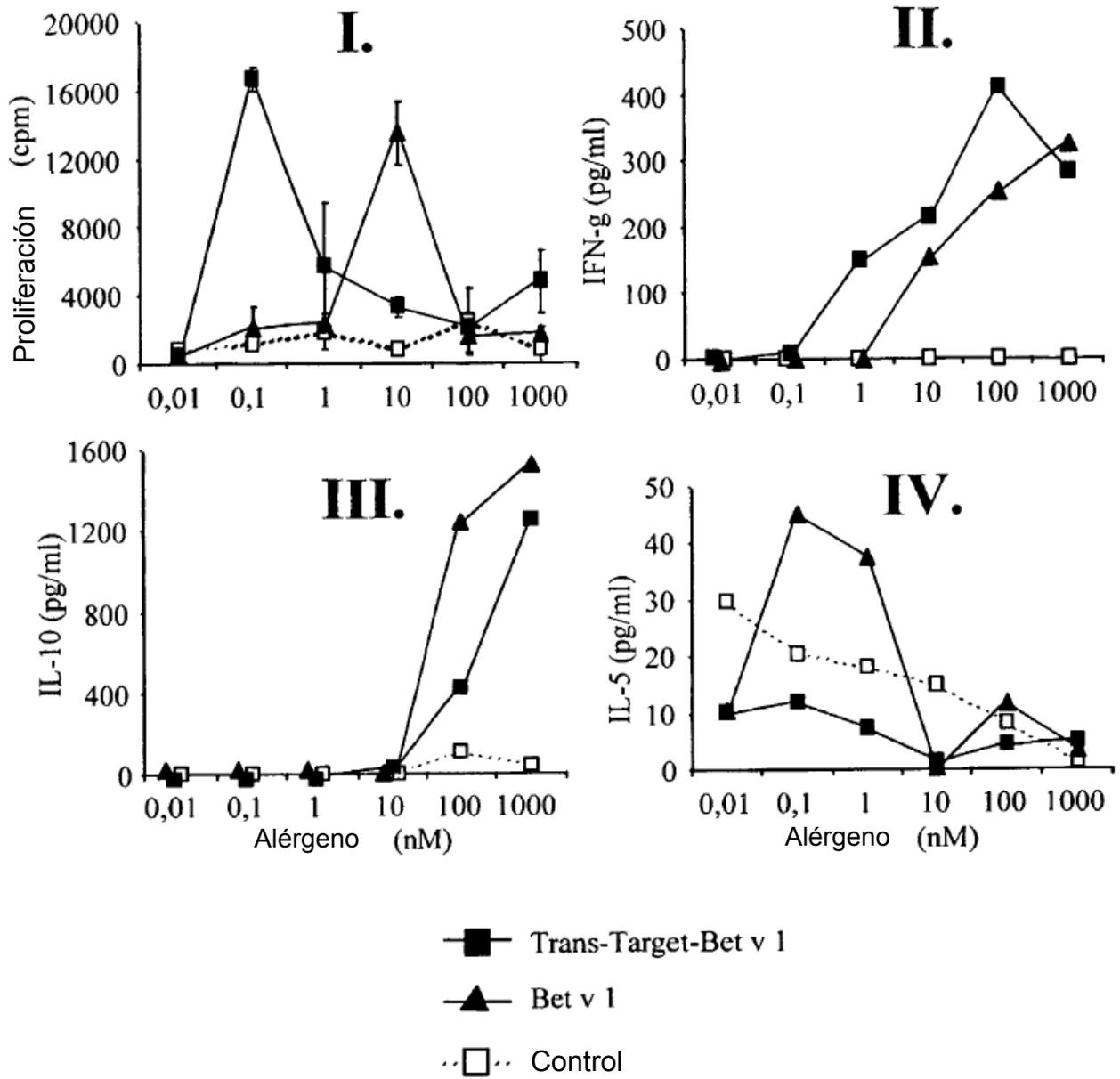


Figura 8B

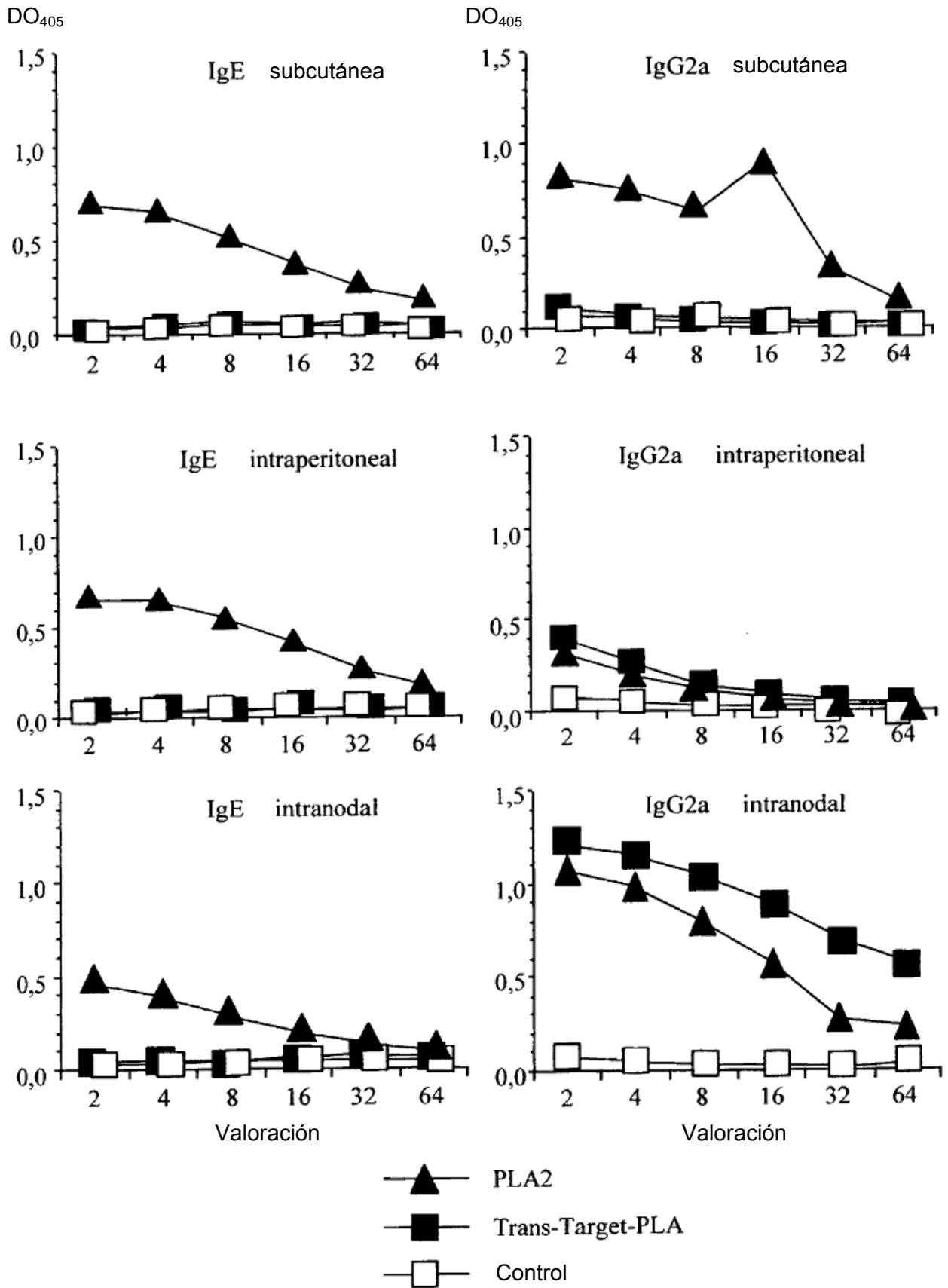


Figura 9