

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 278**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12N 5/0781 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2014 PCT/US2014/030099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2014 E 14723934 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2970427**

54 Título: **Composición formada por un antígeno ligado a un ligando de la superfamilia TNF**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361794520 P

12.11.2013 US 201361903378 P

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

24.07.2020

73 Titular/es:

STONE, GEOFFREY W. (50.0%)

930 Pine Street, Apt. 202

San Francisco, CA 94108, US y

KORNBLUTH, RICHARD S. (50.0%)

72 Inventor/es:

STONE, GEOFFREY W. y

KORNBLUTH, RICHARD S.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 775 278 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

Composición formada por un antígeno ligado a un ligando de la superfamilia TNF

5 **Campo de la invención**

La presente invención generalmente se refiere a proteínas de fusión útiles para generar o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno y a los métodos para usar las proteínas de fusión.

10 **Antecedentes de la invención**

Aplicaciones industriales de las vacunas: Se considera que las vacunas están entre las invenciones médicas protectoras de la salud y de mayor rentabilidad jamás desarrolladas. El fundamento de la vacunación es que la exposición previa del hospedador a una vacuna frente a un agente infeccioso dado puede mejorar o prevenir la enfermedad en caso de que el individuo vacunado llegue a estar expuesto a ese agente en un momento posterior. El intervalo de tiempo entre la vacunación y la posible exposición requiere "memoria" sobre la parte del sistema inmune. Esta memoria se encarna en la persistencia de células inmunes durante años o incluso décadas después de la vacunación. Crear vacunas que inducen protección fuerte y duradera es una tarea difícil, dado a nuestro conocimiento incompleto del sistema inmune. No obstante, los continuos avances en nuestro conocimiento hacen posible nuevos planteamientos para diseñar la vacuna.

Vacunas frente a agentes infecciosos: Para agentes microbianos, muchas vacunas en uso están comprendidas de cepas atenuadas o no virulentas vivas de los microorganismos causantes de la enfermedad. Otras vacunas están comprendidas de microorganismos muertos o si no inactivados. Otras vacunas más utilizan componentes purificados de lisados patógenos, tales como carbohidratos de superficie o proteínas derivadas de patógeno recombinantes. Las vacunas que utilizan patógenos atenuados o inactivados vivos generalmente producen una respuesta inmune vigorosa, pero su uso tiene limitaciones. Por ejemplo, las cepas de vacuna vivas a veces pueden mutar de nuevo a variantes causantes de enfermedad, especialmente cuando se administra a receptores inmunocomprometidos. Además, muchos patógenos, particularmente virus, se someten a mutaciones rápidas continuas en su genoma, lo cual los permite escapar a respuestas inmunes para cepas de vacuna de manera antigénica distinta.

Vacunas para la prevención o el tratamiento de cáncer: Cuando se ha desarrollado el conocimiento de la inmunidad, llega a estar claro que el sistema inmune también controla o intenta controlar el desarrollo de tumores malignos (Dunn et al., 2002;3(11):991-8). Como resultado, actualmente la inmunoterapia está siendo usada para erradicar o controlar ciertos cánceres humanos. Algo de la tecnología y los conceptos de las vacunas frente a agentes infecciosos también se aplica para usar el sistema inmune para luchar los cánceres, tanto tumores sólidos como cánceres sanguíneos tales como leucemia. Los pacientes en riesgo de cáncer, tales como los infectados por virus asociados a cáncer como el virus del papiloma humano (VPH), se pueden proteger de desarrollar el cáncer particular en cuestión como se ilustra por la vacunación Gardasil® frente al virus del papiloma humano (VPH), el cual causa cáncer cervical. Los pacientes que ya tienen cáncer, tal como cáncer de próstata, también pueden ser ayudados por la vacunación, como se ilustra por la vacuna Provenge® que es una inmunoterapia para el cáncer de próstata.

Los linfocitos T CD8+ pueden reconocer antígenos conservados en muchos agentes infecciosos y prevenir la enfermedad: Aunque estas han sido vacunas con éxito, ha habido problemas principales en la construcción de vacunas frente a antígenos a partir de agentes infecciosos de rápida mutación tales como influenza, VIH, y *Plasmodium falciparum* (una causa de la malaria). En estos casos y otros, el agente infeccioso tiene proteína(s) de superficie que puede(n) mutar rápidamente para evitar de otra manera los anticuerpos protectores. No obstante, estos agentes también tienen componentes internos relativamente conservados e invariables como se ilustra por la nucleoproteína (NP) de influenza, Gag y Pol para VIH y la proteína de superficie de circumsporozoito (CSP) para *Plasmodium falciparum*. En estos casos, los anticuerpos (los cuales solamente se pueden unir a la superficie de los patógenos) son incapaces de unirse a estos antígenos más conservados e internos. En cambio, hay un papel bien establecido para los linfocitos T CD8+ en el control o aclarado de tales agentes infecciosos - siempre y cuando se pueda generar una respuesta de linfocito T CD8+ bastante fuerte. Citar solamente tres ejemplos: (1) La protección de la enfermedad causada por influenza se puede conseguir por niveles altos de linfocitos T CD8+ frente a la proteína viral nucleoproteína conservada (NP) (Webster et al., *Eur. J. Immunol.* 1980;10(5):396-401; Slutter et al., *J. Immunol.* 2013;190(8):3.854-8. PMID: 3622175.). (2) Respuestas fuertes de linfocito T CD8+ frente a proteínas Gag y Pol del virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS, un modelo primate no humano para la infección de VIH) pueden proteger a macacos de desarrollar SIDA después de exposición a VIS (Hansen et al., *Nature.* 2011;473(7348):523-7. PMID: 3102768). (3) Los linfocitos T CD8+ frente a antígenos de *Plasmodium falciparum* pueden proteger a los seres humanos de la malaria (Epstein et al., *Science.* 2011;334(6055):475-80). Por tanto, hay una necesidad urgente y largamente insatisfecha de desarrollar mejores maneras de obtener linfocitos T CD8+ fuertes para proteger frente a infección.

Los linfocitos T CD8+ pueden reconocer antígenos cancerosos y curar el tumor maligno: Similar a la situación con agentes infecciosos, los linfocitos T CD8+ también se pueden generar frente a antígenos de célula tumoral. Como se ilustra por los Linfocitos de Infiltración de Tumor (TILs), La administración pasiva de linfocitos T CD8+ anti-tumor

puede ser suficiente para curar pacientes de cánceres avanzados en un pequeño porcentaje de casos (Restifo et al., *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(4):269-81). Estos linfocitos T CD8+ reconocen péptidos denominados "antígenos tumorales" cuando el tumor contiene antígenos o bien no encontrados en tejido normal o presentes a niveles mucho menores. Como se ha indicado anteriormente, algunos antígenos tumorales se derivan de virus tumorigénicos tales como los antígenos E6 y E7 en cáncer cervical relacionado con VPH. Otros antígenos tumorales se derivan de mutaciones en proteínas de la línea germinal tales como la mutación V600E en la proteína BRAF. Otros antígenos tumorales más son proteínas normales tales como HER-2/neu la cual se sobreexpresa en cáncer de mama, cuando la mama es un tejido "desechable" no esencial que se puede sacrificar por un ataque inmune sobre los tejidos derivados de mama. En este caso de nuevo, hay una necesidad urgente y largamente insatisfecha de desarrollar mejores maneras de inducir respuestas fuertes de linfocito T CD8+ para proteger frente al cáncer o tratar pacientes con tumor maligno ya establecido.

Numerosas vacunas con licencia son virus atenuados, vivos (LAV): Como se ha indicado anteriormente, hay un problema principal en la técnica que es que ha sido difícil desarrollar vacunas aplicables industriales que sean capaces de generar linfocitos T CD8+ específicos a antígeno. Para infecciones virales, una de las mejores maneras de generar linfocitos T CD8+ antivirales es vacunar con una vacuna de virus atenuado, vivo (LAV). Ejemplos familiares de vacunas de LAV son la vacuna de Sarampión/Paperas/Rubéola (MMR), vacuna de poliovirus Sabin, vacuna de influenza FluMist®, vacuna del Virus de la Fiebre amarilla 17D, y la vacuna de Vaccinia smallpox. Pero ha sido muy difícil producir vacunas de LAV frente a infecciones virales por diversas razones que incluyen procedimiento de fabricación ineficiente, una necesidad de vacunación repetida con vacunación "de refuerzo" de seguimiento muchos años después, y la calidad generalmente escasa y bajo nivel de la respuesta del linfocito T CD8+ a muchos candidatos de vacuna.

Los linfocitos T CD8+ pueden curar el cáncer en seres humanos pero son difíciles de generar: Para cánceres no asociados con virus, no hay posibilidad de desarrollar una vacuna tipo LAV. En cambio, los antígenos tumorales se deben identificar o si no aislar o prever y usar para la vacunación. Para ser curativo para el cáncer, se necesita una respuesta de linfocito T CD8+ sustancial. Esto se ha demostrado para regímenes que aíslan y aumentan los linfocitos de infiltración de tumor (TIL) que son linfocitos T CD8+ cultivados *ex vivo* y, a continuación, administrados de nuevo a los pacientes. En estos estudios, se requiere que un número relativamente alto de linfocitos T CD8+ TIL erradiquen con éxito y curen el melanoma metastásico (Restifo et al., *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(4):269-81). Muchas vacunas de cáncer e inmunoterapias aparentemente propicias se vuelven demasiado débiles para curar el cáncer cuando se ensayan *in vivo*. Por ejemplo, vacunando simplemente con un péptido antigénico tumoral emulsionado en lípido Montanide como un inmunoestimulante falla en curar el cáncer debido a que los linfocitos T CD8+ resultantes no entran en la circulación y van a los tumores (Hailemichael et al., *Nat. Med.* 2013;19(4):465-72. PMID: 3618499).

Los linfocitos T CD8+ se estimulan por péptidos antigénicos presentados sobre MHC Clase I (MHC-I): Para entender el procedimiento de generación de linfocitos T CD8+, es útil revisar cómo surgen durante una respuesta inmune normal. Los linfocitos T CD8+ se nombran debido a que tienen la proteína CD8 sobre su superficie. CD8 funciona como un "coreceptor" junto con el receptor del linfocito T (TCR) para reconocer los antígenos peptídicos (generalmente 7-11 aminoácidos de longitud) que se procesan dentro de las células por la escisión de las proteínas intactas y, a continuación, se presentan sobre la superficie de las células infectadas por las moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) Clase I (MHC-I). Estas moléculas MHC-I retienen el antígeno peptídico en una "ranura" y el linfocito T CD8+ entonces reconoce el complejo péptido-MHC-I (pMHC-I) y se llega a activar. Los linfocitos T CD8+ que matan la célula infectada se denominan "citotóxicos" pero también pueden interferir con los agentes infecciosos produciendo citoquinas tales como interferón-gamma (IFN-g).

Considerando lo anterior, es altamente deseable encontrar un medio industrialmente aplicable para producir vacunas que sean altamente eficaces para inducir respuestas fuertes de linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, y anticuerpo frente a los agentes infecciosos y antígenos tumorales.

Necesidad de células presentadoras de antígeno (APC) para generar linfocitos T CD8+ específicos a antígeno: Con esto como introducción, se puede apreciar que un episodio clave en la generación de linfocitos T CD8+ es desarrollar un tipo celular llamado una "célula presentadora de antígeno" (APC) que puede presentar pMHC-I para precursores de linfocito T CD8+ no educado o no tratado para inducir que se dividan, aumenten en números, y persistan durante periodos prolongados como linfocitos T CD8+ "memoria" altamente activos. Para ser eficaces en la generación de linfocitos T CD8+, una APC debe tanto expresar antígeno peptídico sobre MHC-I (pMHC-I) que es reconocido por el TCR (llamado "Señal 1") como también coestimular las células que responden a través de receptor adicional (llamado "Señal 2") e incluso otros receptores (llamado "Señal 3"). La estimulación de TCR por pMHC-I proporciona la Señal 1 y generalmente la estimulación del receptor CD28 sobre los linfocitos T CD8+ proporciona la Señal 2. La Señal 3 se puede proporcionar de una manera no redundante o bien por proteínas solubles tales como el interferón alfa (interferón Tipo I) y/o la interleuquina-12 (IL-12) y/o moléculas de la superficie celular tales como el ligando de CD27 (CD27L también llamado CD70 o TNFSF7), 4-1BBL (también llamado CD137L o TNFSF9), y/o OX40L (también llamado CD134L o TNFSF4) (Sanchez y Kedl, *Vaccine*. 2012;30(6):1.154-61. PMID: 3269501). Lo que es necesario es un planteamiento de vacuna que pueda activar una APC para proporcionar todas estas señales. Esto requiere un buen estímulo de célula dendrítica, también llamado un "inmuno adyuvante" o "adyuvante".

Presentación cruzada de APC de antígenos extracelulares: El primer requerimiento para una APC es expresar antígeno peptídico sobre MHC-I (pMHC-I). La APC prototípica es la célula dendrítica que absorbe los antígenos proteicos de su ambiente, degrada estas proteínas en péptidos, carga los péptidos resultantes sobre MHC-I y, a continuación, presenta el pMHC-I sobre su superficie para proporcionar el estímulo de TCR que es la Señal 1. Este proceso es muy diferente de células infectadas por un patógeno microbiano o células tumorales. En esos casos, el antígeno proteico se produce dentro de la propia célula - no se absorbe del espacio extracelular - y, a continuación, los productos de degradación de proteína (los cuales son péptidos) se cargan sobre el MHC-I y se exportan a la superficie celular como pMHC-I para proporcionar la Señal 1. Lo que hace a las células dendríticas y otras APC especiales es que pueden formar pMHC-I a partir de proteínas en su ambiente, un fenómeno denominado "presentación cruzada". Para que las células dendríticas hagan esto, deben absorber el antígeno proteico de su ambiente usando uno de unos pocos receptores muy especializados, incluyendo DEC205, CD11c, BDCA1, BDCA3 y/o CD40. Después de absorber el antígeno proteico del espacio extracelular, estos receptores dirigen la administración del antígeno proteico dentro de compartimentos intracelulares limitados por membrana ("endosomas") en los que la proteína se puede digerir en péptidos y, a continuación, transferirse a los compartimentos en los que MHC-I está siendo ensamblado. De especial importancia para la presente invención es que el mejor receptor sobre las células dendríticas para procesar el antígeno proteico en pMHC-I (es decir, presentación cruzada) es el receptor CD40 (Chatterjee et al., *Blood*. 2012;120(10):2.011-20; Cohn et al., *J. Exp. Med.* 2013;210(5):1.049-63. PMID: 3646496). Por lo tanto, es altamente deseable para una vacuna incluir un antígeno proteico que esté dirigido hacia el receptor CD40 sobre las células dendríticas.

La activación de la APC estimula la presentación cruzada: Un segundo requerimiento para una APC para la presentación cruzada de un antígeno proteico exógeno es que la APC esté "activada". Para las células dendríticas, tal activación se proporciona idealmente por un estímulo eficaz a través del receptor CD40, el cual promueve la presentación cruzada y la formación del pMHC-I Señal 1 (Delamarre et al., *J. Exp. Med.* 2003;198(1):111-22). De manera similar, los linfocitos B, los cuales son otro tipo de APC, se pueden activar por un estímulo del receptor CD40 para presentación cruzada de antígenos proteicos solubles (Ahmadi et al., *Immunology*. 2008;124(1):129-40).

La presentación cruzada del antígeno por células dendríticas en ausencia de estimulación de CD40 conduce a tolerancia del linfocito T CD8+: DEC-205 es un receptor sobre células dendríticas y los linfocitos B reconocidos en células de ratón por el anticuerpo monoclonal NLDC-145 (Inaba et al., *Cellular immunology*. 1995;163(1):148-56). Bonifaz et al. mostraron que la parte de unión de un anticuerpo anti-DEC205 se puede fusionar genéticamente a un antígeno modelo, ovalbúmina (OVA) de pollo. La inyección de la proteína de fusión anti-DEC205/OVA dirige el antígeno OVA a las células dendríticas y conduce a presentación cruzada del antígeno peptídico OVA sobre MHC-I. Sin embargo, mientras este tratamiento induce que los linfocitos T CD8+ anti-OVA se dividan y proliferen, estas células mueren pronto y se suprimen. Esto da como resultado tolerancia específica para OVA que no puede ser vencido por posterior vacunación con OVA más Adyuvante de Freund completo (CFA), el cual normalmente se considera que es un método de referencia para la vacunación (aunque CFA es demasiado inflamatorio para usarse en seres humanos). Sin embargo, si se combina la proteína de fusión anti-DEC205/OVA con un estímulo para el receptor CD40, entonces resultan respuestas de linfocito T CD8+ anti-OVA muy fuertes (Bonifaz et al., *J. Exp. Med.* 2002;196(12):1.627-38. PMID: 2196060). Esto indica que simplemente dirigiendo antígenos a células dendríticas solas (por ejemplo, usando una proteína de fusión de anti-DEC205 y antígeno) no se tiene éxito en la obtención de altos niveles de linfocitos T CD8+ específicos a antígeno eficaces y persistentes. De hecho, muestra que se debería evitar el permitir que el antígeno sea absorbido por células dendríticas inactivadas debido a que trabajará contra el objetivo de crear respuestas fuertes de linfocito T CD8+ específico a antígeno.

Generar respuestas de linfocito T CD8+ es lo mejor cuando el antígeno se administra a células dendríticas junto con un adyuvante: Aunque no usaron un estímulo de CD40, Kamath et al. (*J. Immunol.* 2012;188(10):4.828-37) desarrollaron un sistema de vacuna para administrar un antígeno o bien directamente unido a un antígeno o administrarlo conjuntamente con un antígeno no unido, separado. Cuando el antígeno se administró a DC en ausencia de adyuvante, se indujo la proliferación de linfocitos T específicos a antígeno pero no se diferenciaron posteriormente en células efectoras. En cambio, la inmunidad eficaz solamente se indujo cuando la vacuna de ensayo proporcionó antígeno y adyuvante a las mismas DC individuales en una corta ventana de tiempo. Estos parámetros se cumplen cuando el antígeno y el adyuvante están ligados en el tiempo y en el espacio como partes de la misma molécula, proporcionada por la presente invención.

El documento WO 2011/108937 divulga una proteína de fusión que comprende un antígeno y un ligando capaces de inducir, aumentar o mantener una respuesta inmune de linfocito B.

Para cumplir con la necesidad de una vacuna que induce una fuerte respuesta de linfocito T CD8+, la presente invención proporciona una proteína de fusión que contiene, por ejemplo, ligando de CD40 (CD40L, TNFSF5, el cual es un agonista del receptor CD40) físicamente ligado a un dominio de multimerización que lo organiza dentro de una estructura de muchos trímeros altamente activa además de estar físicamente ligado a un antígeno. De esta manera, el antígeno puede estar dirigido a células dendríticas mediante la unión al receptor CD40 sobre su superficie y activa la célula dendrítica simultáneamente. Esta disposición puede evitar así la administración de antígeno a células dendríticas que no llegan a estar activadas y que en cambio inducirían tolerancia a linfocito T CD8+ específico a

antígeno. Como resultado, las proteínas de fusión de la presente invención proporcionan un alto nivel poco habitual de actividad en la inducción de fuertes respuestas de linfocito T CD8+, cuando los TCR de los linfocitos T CD8+ obtenidos muestran un nivel excepcionalmente alto de avidéz por pMHC-I y cuando una vacuna de la invención confiere sorprendentemente protección profunda de la exposición a un agente infeccioso (Vaccinia que codifica Gag de VIH-1 como un antígeno modelo). Se esperan variaciones sobre estas proteínas de fusión para inducir respuestas muy fuertes de anticuerpo de linfocitos T CD4+ y linfocito B de una manera similar.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención se refiere a una proteína de fusión que comprende los siguientes dominios codificantes de proteína ligados operativamente por enlaces peptídicos en el siguiente orden: un armazón de multimerización formado por una parte de una proteína colectina, en el que la parte de la colectina se autoensambla dentro de dos o más brazos tipo colágeno triméricos de la colectina unidos a su extremo N-terminal por una región nodo (*hub*) ligada a disulfuro de la colectina, un antígeno, en el que el antígeno está contenido dentro del armazón de multimerización, en el que el antígeno se coloca dentro de la parte del armazón de multimerización que forma el brazo de la colectina, y un dominio extracelular de un ligando de la superfamilia TNF, en el que el ligando de la superfamilia TNF se selecciona del grupo que consiste en CD40L (TNFSF5), CD27L (TNFSF7), CD137L (TNFSF9), OX40L (TNFSF4), GITRL, 4-1BBL, RANKL, LIGHT, CD70 y BAFF o un anticuerpo de cadena sencilla que se une a un receptor de TNFSF. La invención proporciona proteínas de fusión que comprenden antígenos de agentes de enfermedad infecciosa y células cancerosas ligados a formas de muchos trímeros de ligandos de la superfamilia TNF (TNFSF). Los TNFSF sirven como adyuvantes de vacuna para incrementar la respuesta inmune a los antígenos. En particular, se mostró que una hebra polipeptídica de fusión que se autoensambla dentro de una forma de muchos trímeros de ligando CD40 (CD40L, TNFSF5) induce respuestas sorprendentemente fuertes frente a un agente de enfermedad infecciosa y un antígeno tumoral. Se contemplan otras proteínas de fusión similares y se prevé su construcción en la solicitud. Las proteínas de fusión se pueden administrar a un hospedador o bien como ácidos nucleicos directamente usados en la vacunación de ADN o portadas y expresadas por un vector viral tal como adenovirus. Se contempla que las proteínas de fusión aisladas también se podrían administrar con buen efecto. Además de usarse como vacuna para prevenir o mejorar la enfermedad causada por un agente infeccioso, las proteínas de fusión de la invención se pueden usar para el tratamiento de infección en desarrollo o para inmunoterapia del cáncer.

Para crear una vacuna que induzca eficazmente respuestas fuertes de linfocito T CD8+, se construyeron formas altamente activas de ligandos de la superfamilia TNF (TNFSF) como proteínas de fusión con antígenos de ensayo de agentes de enfermedad infecciosa y tumores. Usando el ligando CD40 (CD40L también llamado TNFSF5) como un TNFSF a modo de ejemplo, las proteínas de fusión resultantes se dieron a ratones en la forma de una vacuna de ADN (mediante inyección de ADN plásmido en músculo) como medio para administrar antígeno a células dendríticas y activar estas células a través de su receptor CD40 en el mismo momento. Este planteamiento minimiza la administración separada de antígeno a células dendríticas que se han activado por adyuvante, lo cual de otra manera daría como resultado tolerancia de linfocito T CD8+ como se muestra por Bonifaz et al. (*J. Exp. Med.* 2002;196(12):1.627-38. PMID: 2196060) y Kamath et al. (*J. Immunol.* 2012;188(10):4.828-37). En este caso a modo de ejemplo, esta invención combina uno de los mejores adyuvantes de vacuna para la activación de célula dendrítica (es decir, CD40L) junto con dirigir el antígeno a células dendríticas gracias a que el antígeno se une operativamente al CD40L (el ligando para el receptor CD40) el cual se une a CD40 y administra el antígeno a las células dendríticas para la presentación cruzada como pMHC-I. Los intentos previos de ligar CD40L con antígeno fueron defectuosos por el diseño molecular defectuoso y no dieron como resultado dicha vacuna poderosa. En cambio, el planteamiento de la presente invención proporciona una combinación de tal manera para proporcionar una respuesta sorprendentemente fuerte de linfocito T CD8+ que es altamente protectora. Al seleccionar el(los) antígeno(s) apropiado(s) y TNFSF y un método de administración apropiado, las aplicaciones incluyen vacunas frente a agentes infecciosos y células malignas. Usando proteínas de fusión directamente o como sus secuencias de ácidos nucleicos codificantes administradas por una vacuna de ADN o ARN o por un vector viral tal como adenovirus, la invención tiene sustancial aplicación industrial.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Dibujo esquemático que ilustra la necesidad de agruparse de un receptor de TNFSF tal como el receptor CD40 sobre células dendríticas y otras APC para proporcionar un fuerte estímulo celular. Este requerimiento de agrupación afecta al diseño de una forma eficaz del ligando TNFSF o un anticuerpo anti-unión a receptor de TNFSF.

Figura 2: Los anticuerpos anti-CD40 agonísticos pueden agruparse a receptores CD40 siempre que se unan a y se "monten" sobre una célula cercana que exprese receptores para la cola Fc de la molécula de anticuerpo. Abreviaturas: FcγR - el receptor para la parte Fc de la inmunoglobulina G (IgG). MAb Anti-CD40 - Anticuerpo monoclonal que se une a CD40.

Figura 3: Diseño molecular de proteínas de fusión que crean formas de muchos trímeros de CD40L soluble. A la izquierda es un esquema para una forma de 1-trímero de CD40L que no se puede agrupar al receptor CD40 y

como resultado es inactiva, como se muestra por Haswell et al. (*Eur. J. Immunol.* 2001;31(10):3.094-100) y Holler et al. (*Mol. Cell. Biol.* 2003;23(4):1.428-40) y se describe en el documento EP 1246925 B1. Como previamente se ha descrito (Stone et al., *J. Virol.* 2006; 80(4): 1.762-72) y presentado en los documentos US 7.300.774 B1 y US 7.332.298 B2, y también en el documento EP 1246925 B1, el dominio extracelular (ECD) de CD40L se puede fusionar genéticamente a proteínas formadoras de armazón tales como Acrp30 (mitad) o proteína surfactante D (SPD) (derecha). La proteína Acrp30-CD40L de 2 trímeros también se llama MegaCD40L™ o hexámero CD40L, mientras que la proteína SP-D-CD40L de 4 trímeros también se llama UltraCD40L™. Estas formas de muchos trímeros de CD40L pueden agruparse al receptor CD40 y actuar como un adyuvante de vacuna. Esto ocurre en parte por la activación de las células dendríticas (Miconnet y Pantaleo, *Vaccine.* 2008;26(32):4.006-14).

Figura 4: Las proteínas de fusión CD40L de dos y cuatro trímeros son adyuvantes de vacuna para las respuestas de linfocito T CD8+. Se vacunaron ratones por inyección de ADN plásmido "desnudo" en músculo para ensayar diferentes formas de CD40L como adyuvante para el antígeno Gag de VIH-1. En el panel A, las respuestas del linfocito T CD8+ se detectaron como muerte de células diana P815 pulsadas con péptido Gag. En el Panel B, las respuestas del linfocito T CD8+ se detectaron midiendo el número de células secretoras de interferón gamma individuales en respuesta al antígeno peptídico Gag usando un ensayo ELISPOT. Había una mejora distinta en las respuestas del linfocito T CD8+ usando una forma de 2 trímeros de CD40L (Acrp30-CD40L) y más preferiblemente una forma de 4-trímeros de CD40L (SPD-CD40L) (Stone et al., *J. Virol.* 2006;80(4):1.762-72). Para mostrar la aplicabilidad general de este planteamiento, se usó un sistema de ensayo de vacuna similar usado para mostrar que los otros ligandos TNFSF se podrían multimerizar como proteínas de 4 trímeros y usarse como adyuvantes de vacuna, incluyendo GITRL, 4-1BBL, OX40L, RANKL, LIGHT, CD70, y BAFF (Kanagavelu et al., *Vaccine.* 2012;30(4):691-702. PMID: 3253891).

Figura 5: Diseño molecular de proteínas de fusión CD40L multiméricas que contienen una inserción estructural que codifica Gag de VIH-1 como un antígeno modelo. Parte superior: pSPD-Gag-CD40L es un plásmido que contiene un antígeno insertado en la hebra proteica que da como resultado una forma de 4 trímeros de CD40L. Al nivel de ácido nucleico, los codones para un antígeno modelo, Gag de VIH-1, se colocaron en la secuencia codificante de la construcción SPD-CD40L. En la proteína traducida resultante, el extremo N-terminal está formado por un péptido señal de secreción de SPD seguido de una secuencia N-terminal de la SPD denominada el "nodo" que contiene 2 cisteínas en cada hebra, produciendo de ese modo enlaces disulfuro que (a) acoplan covalentemente tres hebras polipeptídicas individuales juntas para formar un "brazo" y (b) acoplan covalentemente 4 brazos triméricos en la cadena 12 final, la estructura de 4 brazos mostrada abajo a la izquierda de la figura (en la que el antígeno Gag insertado se muestra como un bulto sólido en cada brazo de la proteína). Indicar que la secuencia de antígeno Gag estaba situada entre los aminoácidos 105 y 106 de la proteína SPD murina, mientras que se retiene el dominio de CD40L previamente construido en el extremo C-terminal. Como molécula SPD-CD40L parental, esta hebra proteica de SPD-Gag-CD40L se autoensambla espontáneamente dentro de las células en una forma de muchos trímeros, multimérica de CD40L que, a continuación, se secreta dentro del espacio extracelular. 2º de la Parte superior: pTrimer-Gag-CD40L (marcado pTr-Gag-CD40L) es un plásmido construido por delección de los condones para los aminoácidos 24-105 de la SPD murina. Este retira la región nodo que contiene las 2 cisteínas. También se incluye la secuencia peptídica de la señal t-PA para la secreción. Esto da como resultado la producción de una forma de 1 "brazo", de trímero único, de la proteína antígeno Gag-CD40L, como se muestra a la derecha de la parte inferior de la figura (donde el antígeno Gag se muestra como un bulto sólido en esta forma de 1 trímero de CD40L). 3º de la Parte superior: pGag es el plásmido que codifica los aminoácidos para el antígeno p55 Gag precedido por la secuencia señal t-PA para la secreción, como se describe por Qiu et al., (*J. Virol.* 1999;73(11):9.145-52). Esta es una construcción de antígeno control que no tiene adyuvante de CD40L. 4º de la Parte superior: pSPD-CD40L es el plásmido que codifica una forma de 4 trímeros del CD40L previamente descrito por Stone et al. (*J. Virol.* 2006;80(4):1.762-72) y en los documentos US 7.300.774 B1 y US 7.332.298 B2. Esta es una proteína únicamente adyuvante que no contiene un antígeno. Se puede, sin embargo, administrar conjuntamente con un plásmido antigénico tal como pGag, como se muestra en la Figura 4.

Figura 6: pSPD-Gag-CD40L codifica una proteína secretada. El Panel A muestra una transferencia Western de un análisis en gel SDS-PAGE reductor de los medios de cultivo de células 293T que se sometieron a transfección transitoriamente con ADN para los plásmidos mostrados. Se usó un anticuerpo para CD40L murino para revelar las bandas de proteína. Como se muestra, pSPD-Gag-CD40L codifica una proteína única del tamaño esperado de 105 kDa. También se observó una banda única de 105 kDa usando el anticuerpo a la porción p24 de Gag (no mostrada). El Panel B muestra un análisis similar usando PAGE no desnaturalizante en ausencia de un agente reductor. Se observaron bandas múltiples a >200 kDa de peso molecular, demostrando la formación de grandes complejos multiméricos. Como se observa comúnmente en tales análisis de proteínas tipo colágeno, la desnaturalización parcial durante el proceso puede dar como resultado un desenrollamiento de algo de la triple hélice de colágeno, lo cual por tanto podría conducir a una proteína menos compacta que se mueve más lentamente a través del gel durante el proceso electroforético.

Figura 7: Ensayo calificativo para la actividad biológica de SPD-Gag-CD40L *in vitro*. Panel A: Actividad *in vitro* usando una línea celular indicadora NF- κ B de receptor CD40. Para producir proteína soluble, se sometieron a transfección transitoriamente células 293T con plásmidos para pcDNA3.1 (control de vector vacío), pSPD-

CD40L, o pSPD-Gag-CD40L y los sobrenadantes que contenían proteína se recogieron 48 horas después. Para determinar la actividad del CD40L en estas proteínas, se añadió medio de cultivo a los cultivos de células indicadoras 293 que contenían un gen dirigido a NF- κ B para fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y que expresaba el receptor CD40 (células indicadoras CD40-293-SEAP). Si el receptor CD40 se activa por CD40L, entonces la producción de SEAP dirigida a NF- κ B da como resultado la secreción de SEAP que se puede medir por ensayo de enzima colorimétrica a DO650 (Maurais et al., *Virology*. 2009;385(1):227-32). En este ensayo, un trímero único de CD40L (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) se inactivó enteramente y no indujo producción de SEAP (no mostrado), indicando el requerimiento estricto para una forma de muchos trimeros de CD40L para la actividad en este ensayo. Por el contrario, tanto la proteína adyuvante pSPD-CD40L como la nueva proteína SPD-Gag-CD40L de la presente invención eran activas como activadores de receptor CD40. Panel B: Estimulación de la actividad sobre células dendríticas de médula ósea de ratón (BMDDC). Como en el Panel A, los sobrenadantes de cultivo de las células 293T sometidas a transfección con pcDNA3.1 o pSPD-Gag-CD40L se incubaron con BMDDC durante 18 horas. Las células se lavaron, se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo, y se ensayaron por citometría de flujo para la expresión de marcadores de activación y maduración. La proteína SPD-Gag-CD40L reguló al alza CD80 y especialmente CD86 y CCR7, indicando que esta proteína de fusión era completamente capaz de activar células dendríticas normales. Como cabía esperar, el receptor CD40 se reguló a la baja mediante la exposición a SPD-Gag-CD40L. Se usó una mezcla de citoquina como control positivo ("Mimic", que consistía en 10 ng/ml de rhTNF-alfa, 10 ng/ml de rhIL-1beta, 1.000 U/ml de rhIL-6 y 1 μ g/ml de PGE2; Sato et al., *Cancer Sci*. 2003;94(12):1.091-8). * p < 0,05, ** p < 0,01, y *** p < 0,001 en comparación con el sobrenadante de pcDNA3.1. Los datos representan pocillos independientes en el mismo experimento.

Figura 8: La vacunación de ADN con pSPD-Gag-CD40L demuestra un nivel sorprendentemente alto de respuestas de linfocito T CD8+. Panel A: Calendario de vacunación de ADN. Se vacunaron ratones tres veces a intervalos de dos semanas con una inyección intramuscular de 100 μ g de ADN plásmidos. Paneles B y C ensayo ELISPOT de CD8+. Para medir la respuesta del linfocito T CD8+ específico a Gag, se recogieron células de bazo 14 días después de la última vacunación y se ensayaron por ensayos ELISPOT. El Panel B muestra células productoras de interferón-gamma y el Panel C muestra células productoras de IL-2. La vacunación control es pGag + pcDNA en la que se usó pcDNA3.1 (pcDNA) vacío para mantener la cantidad total de ADN constante. La mezcla previamente informada de plásmido de antígeno y adyuvante de CD40L de 4-trímeros es pGag + pSPD-CD40L que consiste en plásmidos separados para antígeno y adyuvante, es decir, no presentes en la misma molécula secretada. Sorprendentemente, pSPD-Gag-CD40L, el sujeto de la presente invención, dio como resultado una respuesta masiva del linfocito T CD8+ específico a antígeno (indicar que un eje Y roto es necesario para mantener los resultados visibles en la gráfica). Por el contrario, pGag + pIL-12 dio respuestas más modestas de linfocito T CD8+, aunque actualmente se está evaluando un plásmido pIL-12 en pruebas de vacuna humana. El Panel C muestra el mismo análisis usando el ensayo ELISPOT de IL-2 y mostró la sorprendente fuerza de pSPD-Gag-CD40L, el sujeto de la presente invención.

Figura 9: La vacunación de ADN con pSPD-Gag-CD40L demuestra una mejora sorprendente en la calidad de linfocito T CD8+. Panel A: Aidez del receptor de linfocito T para el antígeno peptídico/MHC-I medida por ensayo ELISPOT. Se cultivaron esplenocitos con diluciones en serie de péptido específico a linfocito T CD8+ AMQMLKETI durante 18 horas. Los esplenocitos de ratones vacunados con pSPD-Gag-CD40L indujeron un incremento significativo en ELISPOT de IFN- γ después de la estimulación con péptido Gag AMQMLKETI a una concentración de 1 ng/ml y 10 pg/ml mientras que hubo esencialmente no actividad a estas dosis usando esplenocitos de ratones vacunados con antígeno pGag solo o una mezcla de plásmidos separados para pGag y adyuvante pSPD-CD40L. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 en comparación con vacunación de pGag solo o pGag + SPD-CD40L. Panel B: Respuestas del anticuerpo IgG frente a antígeno Gag. Se midió la IgG total específica para Gag por ensayo ELISA a partir de suero de ratón recogido el día 42. Consistente con un estudio previo (Stone et al., *J. Virol*. 2006;80(4):1.762-72), el adyuvante CD40L usado en este formato no es un adyuvante para respuestas de anticuerpo.

Figura 10: La estructura multitrímica de SPD-Gag-CD40L es necesaria para el efecto de vacuna mejorado. En los Paneles A y B, se usó pTrimer-Gag-CD40L como control de 1-trímero para pSPD-Gag-CD40L de 4-trímeros. Como se muestra, la estructura de muchos trimeros era necesaria para el efecto adyuvante fuerte.

Figura 11: Efectos protectores de la vacunación de pSPD-Gag-CD40L medida por exposición viral de Gag de vaccinia. Se inmunizaron intramuscularmente ratones hembra BALB/c con los plásmidos mostrados los días 0, 14 y 28. Dos semanas después de la vacunación final, los ratones se expusieron intraperitonealmente a 10^7 unidades formadoras de placa (UFP) de Gag de vaccinia. Los ratones se sacrificaron 5 días después de la exposición viral y se recogieron los ovarios y se analizaron por UFP. Panel A: La vacunación de ADN intramuscular con pSPD-Gag-CD40L dio como resultado protección significativamente mayor a partir de la exposición viral. Por el contrario, la vacunación de ADN con un mezcla de antígeno pGag más adyuvante pSPD-CD40L como plásmidos separados solamente indujo una reducción modesta en las cargas virales que no se redujeron significativamente en comparación con antígeno pGag solo. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Panel B: Evaluación de una construcción pTrimer-Gag-CD40L de trímero único. Como se ha mostrado anteriormente, la estructura multitrímica de SPD-Gag-CD40L es necesaria para el efecto de vacuna mejorado.

Figura 12: La administración de vector adenoviral de SPD-Gag-CD40L es sorprendentemente protectora frente a la exposición de virus. Se inmunizaron intramuscularmente ratones hembra BALB/c los días 0 y 14 con adenovirus 5 (Ad5) que expresan el antígeno Gag de VIH-1 (Ad5-Gag) o la construcción SPD-Gag-CD40L (Ad5-SPD-Gag-CD40L). Dos semanas después de la vacunación final, los ratones se expusieron intraperitonealmente a virus vaccinia-Gag (10^7 UFP). Los ratones se sacrificaron 5 días después y se recogieron los ovarios para las determinaciones de UFP de vaccinia. Sorprendentemente, la vacunación de Ad5-SPD-Gag-CD40L redujo la carga viral en aproximadamente 7 logs después de la exposición a vaccinia-Gag. El virus no detectable se podría encontrar en los ratones que habían recibido esta vacuna, indicando protección completa (inmunidad esterilizante).

Figura 13: Construcción y transferencia Western de SPD-gp100-CD40L. Panel A: Modelo de la fusión SPD-gp100-CD40L. Se insertaron los aminoácidos 25 a 596 (secuencia KVPRNQD a EAGLGQV) de gp100 humana entre los aminoácidos 105 y 106 de SPD murina dentro de la construcción de fusión SPD-CD40L. Panel B: Diagrama esquemático de la estructura esperada de 4 trimeros de SPD-gp100-CD40L. Panel C: Análisis de transferencia Western. Se sometieron a transfección células 293T con plásmido ADN que codifica gp100 o la proteína de fusión SPD-gp100-CD40L. Después de cultivo de 48 horas, se recogió el sobrenadante y se corrió sobre un gel SDS-PAGE en presencia de agente reductor. Se realizó transferencia Western usando un anticuerpo policlonal a gp100.

Figura 14: Actividad biológica de SPD-gp100-CD40L. Panel A: Se determinó la actividad *in vitro* de SPD-CD40L y SPD-gp100-CD40L usando un sistema informador enzimático CD40 NF- κ B basado en célula. Se incubó una cantidad equivalente de sobrenadante de 293T de células sometidas a transfección con pcDNA3.1, pSPD-CD40L o pSPD-gp100-CD40L con células informadoras 293-CD40-SEAP NF- κ B. Panel B: Se evaluó la actividad *in vitro* de SPD-gp100-CD40L sobre DC de ratón derivada de médula ósea de ratón y se comparó con vector vacío o control positivo de citoquina Mimic. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por el ensayo de la t de Student en comparación con el sobrenadante de pcDNA3.1.

Figura 15: Inmunoterapia de tumores de melanoma B16F10 establecidos. Panel A: Calendario de inmunización para la exposición del tumor B16-F10 y vacunación terapéutica con ADN/GVAX, como se indica por las flechas. Se inyectaron i.d células B16F10 (50.000) dentro del flanco izquierdo de ratones C57BL/6 el día 0. A continuación, se inmunizaron los ratones por inyección i.m. de PBS o plásmido pSPD-gp100-CD40L el día 3, 10 y 17. GVAX, las células tumorales B16F10 que expresan GM-CSF, se irradiaron a 5.000 rad y 1×10^6 células se inyectaron subcutáneamente el día 3, 6, y 9. Panel B: Análisis del crecimiento tumoral. Cada punto representa el volumen de tumor medio en cada grupo (n=5). No observamos una diferencia estadística en los tamaños tumorales entre los grupos de no tratamiento (PBS) y vacunación con SPD-gp100-CD40L. Panel C: Análisis de supervivencia basado en la fecha de muerte o cuándo el tamaño tumoral alcanzaba $>1.500 \text{ cm}^2$. No se observaron diferencias estadísticas en la supervivencia entre los grupos.

Figura 16: Inmunoterapia de tumores de melanoma B16F10 establecidos por vacunación con ADN con una combinación de pSPD-gp100-CD40L, pIL-12p70 y pGM-CSF. Panel A: Calendario de inmunización para la exposición del tumor B16F10 y vacunación con ADN/GVAX, como se indica por las flechas. Se inyectaron i.d células B16F10 (50.000) dentro del flanco izquierdo de los ratones el día 0. Los ratones se inmunizaron i.m. con PBS, pSPD-gp100-CD40L + pIL-12, pSPD-gp100-CD40L + pGM-CSF, o pSPD-gp100-CD40L + pIL-12 + pGM-CSF el día 3, 10, y 17. Para terapia con GVAX las células de tumor B16-F10 que expresan GM-CSF (GVAX), se irradiaron a 5.000 rad y se inyectaron subcutáneamente 1×10^6 células el día 3, 6 y 9. Panel B: Análisis del crecimiento tumoral. Cada punto representa el volumen de tumor medio de los animales en cada grupo (n=5). Había una reducción significativa en las cinéticas del crecimiento tumoral para ratones vacunados con SPD-gp100-CD40L + IL-12 + GM-CSF en comparación con otros grupos. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con grupos de vacunación con PBS o SPD-gp100-CD40L + IL-12 o SPD-gp100-CD40L + GM-CSF). Panel C: Análisis de supervivencia de ratones. Observamos un incremento significativo en la supervivencia y la supervivencia libre de tumor (dato de la aparición de tumor) para ratones vacunados con pSPD-gp100-CD40L + pIL-12 + pGM-CSF en comparación con otros grupos (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con los grupos de vacunación con PBS, pSPD-gp100-CD40L + pIL-12, o pSPD-gp100-CD40L + pGM-CSF). Panel D: Cinéticas de crecimiento tumoral de ratones individuales de cada grupo de tratamiento.

Figura 17: La expresión separada de proteínas gp100 y SPD-CD40L falla en inducir actividad anti-tumoral. Como control para pSPD-gp100-CD40L, se ensayaron varios otros planteamientos de tratamiento anti-tumoral y se encontraron que eran inferiores. Panel A: Calendario de inmunización para la exposición del tumor B16F10 y vacunación con ADN, como se indica por las flechas. Se inyectaron células B16-F10 (50.000) dentro del flanco izquierdo de los ratones el día 0. Los ratones se inmunizaron i.m. con PBS, pgp100, pgp100 + pIL-12, pgp100 + pGM-CSF, pgp100 + pIL-12 + pGM-CSF, o pgp100-IRES-SPD-CD40L + pIL-12 + pGM-CSF el día 3, 10, y 17. Panel B: Análisis del crecimiento tumoral. Cada punto representa el volumen de tumor medio de los animales en cada grupo (n=5). No observamos ninguna diferencia estadística en tamaño tumoral entre los grupos de vacunación. Panel C: Análisis de supervivencia. No se observaron ninguna diferencia estadística en la supervivencia de ratones entre grupos.

Breve descripción de las secuencias

Las secuencias no incluidas en el alcance de las reivindicaciones son solamente con fines ilustrativos.

5
 SEQ ID NO 1: Secuencia de ADN para muSP-D-Gag-muSP-D-muCD40L. Esta es la secuencia de ADN de una proteína de fusión que usa las secuencias murinas para SPD y CD40L. Debido a diferencias menores entre especie, es preferible usar una secuencia murina para la administración a ratones, una secuencia de macaco para la administración en monos (Stone et al., *Clin. Vaccine Immunol.* 2006;13(11):1.223-30), una secuencia humana para la administración a seres humanos, etc. Esto minimiza la posibilidad de formar anticuerpos frente a una proteína xenogénica, distinta del antígeno contenido en la construcción. En este ejemplo, lo que se muestra es la secuencia de ácidos nucleicos usada para los experimentos mostrados en las Figuras 6-12. (Indicar que la proteína surfactante D se abrevia diversamente como "SPD" o "SP-D". La localización del inserto de antígeno Gag se muestra no en cursiva.

10
 SEQ ID NO 2: Secuencia proteica para muSP-D-Gag-muSP-D-muCD40L. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 1.

15
 SEQ ID NO 3: Secuencia de ADN para tpa-muACRP30-gp120-muACRP30-muBAFF. Esta es una secuencia de ADN de una proteína de fusión que usa la forma de 2 trómeros previamente descrita de Acrp30-BAFF dentro de la cual se ha insertado una secuencia de ADN de envoltura de gp120 de VIH-1 como antígeno. Se contempla que la proteína de fusión de 2-trómeros codificada por esta secuencia de ácidos nucleicos activará el receptor de linfocito B (BCR) de unión a gp120 de Env sobre los linfocitos B y se ocuparán simultáneamente receptores para BAFF sobre estos linfocitos B que sinergizan con la activación de BCR para estimular el linfocito B para producir anticuerpos anti-Env.

20
 SEQ ID NO 4: Secuencia proteica para tpa-muACRP30-gp120-muACRP30-muBAFF. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 3.

25
 SEQ ID NO 5: Secuencia de ADN para muSP-D-gp100-muSP-D-muCD40L. Esta es la secuencia de ADN de una proteína de fusión que usa las secuencias murinas para SPD y CD40L. El antígeno insertado (secuencia no en cursiva) se codifica por la secuencia de nucleótidos para gp100 humana, un antígeno xenogénico que se ha encontrado que es útil en los estudios de melanoma en ratones (Gold et al., *J. Immunol.* 2003;170(10):5.188-94).

30
 SEQ ID NO 6: Secuencia proteica para muSP-D-gp100-muSP-D-muCD40L. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 5.

35
 SEQ ID NO 7: Secuencia de ADN para tpa-hulgG1Fc-gp120-GCN4-huAPRIL. Esta es una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal t-PA humana para secreción proteica unida en la estructura con la región Fc de IgG1 humana unida en la estructura con gp120 de Env de VIH-1 unida en la estructura con el motivo de trimerización GCN4 unido en la estructura con el dominio extracelular de APRIL humana. Se contempla que la proteína de fusión de 2-trómeros codificada por esta secuencia de ácidos nucleicos activará el receptor de linfocito B (BCR) de unión a gp120 de Env sobre los linfocitos B y se ocuparán simultáneamente los receptores para APRIL sobre estos linfocitos B que sinergizan con la activación de BCR para estimular el linfocito B para producir anticuerpos anti-Env.

40
 SEQ ID NO 8: Secuencia proteica para tpa-hulgG1Fc-gp120-GCN4-huAPRIL. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 7.

45
 SEQ ID NO 9: Secuencia de ADN para huSP-D-NP-huSP-D-huCD40L-NST. Se encontró previamente que algunas realizaciones de SPD-CD40L pueden ser igualmente o más activas cuando se somete a delección la región "tallo" (*stalk*) extracelular de CD40L. Este tallo liga el dominio extracelular trimérico (ECD) de CD40L con la región transmembrana que retiene el CD40L en la membrana. La construcción SPD-CD40L-NST se divulga en el documento US 2009/0081157 A1 (véase especialmente la Figura 21, Ejemplos 1, 11 y 13). La presente secuencia comprende una inserción de secuencias codificantes para el antígeno de nucleoproteína (NP) de influenza A. Se contempla que la proteína de fusión de 4 trómeros codificada por esta secuencia de ácidos nucleicos inducirá respuestas fuertes de linfocito T CD8+ frente a este antígeno de influenza conservado.

50
 SEQ ID NO 10: Secuencia proteica para huSP-D-NP-huSP-D-huCD40L-NST. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 9.

55
 SEQ ID NO 11: Secuencia de ADN para tpa-muACRP30-CSP1-muACRP30-muCD40L. Esta es una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal t-PA humana para la secreción de proteína unida en la estructura con una parte de la secuencia de Acrp30 murina unida en la estructura con los codones para la proteína-1 de circumporozoito (CSP-1) de *Plasmodium yoelii* unida en la estructura con una parte de la secuencia de Acrp30 murina unida en la estructura con el dominio extracelular de CD40L murino. *Plasmodium yoelii* se usa para

estudios de la vacuna de la malaria debido a que causa una enfermedad tipo malaria en ratones. Los linfocitos T CD8+ dirigidos contra el antígeno CSP-1 de este agente puede proporcionar inmunidad a malaria (Sedegah et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95(13):7.648-53). Se contempla que los ratones vacunados con esta construcción serán resistentes a la enfermedad causada por exposición intravenosa a glóbulos rojos infectados con *Plasmodium yoelii*.

SEQ ID NO 12: Secuencia proteica para tpa-muACRP30-CSP1-muACRP30-muCD40L. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 11.

SEQ ID NO 13: Secuencia de ADN para muSP-D-Gag-muSP-D-muRANKL. Esta es una secuencia de ADN que codifica una parte de la secuencia de SPD murina unida en la estructura con los codones para el antígeno Gag de VIH-1 unidos en la estructura con una parte de la secuencia de Acrp30 murina unida en la estructura con el dominio extracelular de RANKL murina. Especialmente hay que indicar la diferencia de posición en la colocación del antígeno dentro de la secuencia de los "brazos" de SPD, en este caso desplazada hacia el extremo 5' (o extremo N-terminal en la proteína) el equivalente de 10 codones en la secuencia de SPD. Se contempla que esta construcción usada como vacuna inducirá respuestas inmunes fuertes en ratones.

SEQ ID NO 14: Secuencia proteica para muSP-D-Gag-muSP-D-muRANKL. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 13.

SEQ ID NO 15: Secuencia de ADN de huSP-D-WT1-huSP-D-huCD40L. Esta es una secuencia de ADN que codifica una parte de la secuencia de SPD humana unida en la estructura con los codones para la proteína WT1 unidos en la estructura con una parte de la secuencia de SPD unida en la estructura con el dominio extracelular de CD40L humano. WT1 es un antígeno tumoral presente en muchos tipos de cáncer humano (Chaise et al., *Blood.* 2008;112(7):2.956-64). Se contempla que esta construcción usada como vacuna inducirá respuestas inmunes fuertes en humanos frente a células cancerosas que expresan el antígeno tumoral WT1.

SEQ ID NO 16: Secuencia proteica para huSP-D-WT1-huSP-D-huCD40L. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 15.

SEQ ID NO 17: Secuencia de ADN de muSP-D-MAGE-A3-muSP-D-muBAFF. Esta es una secuencia de ADN contemplada que codifica una parte de la secuencia de SPD murina unida en la estructura con los codones para el antígeno tumoral MAGE-A3 humano (Groeper et al., *Int. J. Cancer.* 2007; 120(2):337-43) unidos en la estructura con una parte de la secuencia de SPD murina unida en la estructura con el dominio extracelular de BAFF murina. Hay que indicar que se han sometido a delección los codones para 20 aminoácidos (PPGLPGIPGP-MGARASVLSG) en la mitad N-terminal del brazo de SPD. Esto ilustra cómo se pueden acortar N-terminal los "brazos" de SPD al sitio de inserción de la secuencia de antígeno. También se contemplan delecciones similares en la mitad del extremo C-terminal del brazo de SPD, cuando son delecciones en ambos lados de los brazos de SPD que flanquean el sitio de inserción de la secuencia de antígeno.

SEQ ID NO 18: Secuencia proteica de muSP-D-MAGE-A3-muSP-D-muBAFF. Esta es la traducción de la SEQ ID NO 17.

Definiciones

Esta divulgación usa conceptos y métodos reconocidos por la técnica. El experto en la técnica estará familiarizado con las fuentes incluyendo las siguientes: "Janeway's Immunology" de Kenneth Murphy, Garland Science Press, 2011; "Fundamental Immunology" de William E. Paul, Lippincott Williams & Wilkins, 2008; "Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition" de Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman, y Shiv Pillai, Elsevier Press, 2011; "Current Protocols in Immunology", Wiley Press, 2012; y "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Press, 2012. Además, se mencionan las siguientes patentes y aplicaciones: US 7.300.774 B1; US 7.332.298 B2; US 2009/0081157 A1.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, "Genes V", publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), "The Encyclopedia of Molecular Biology", publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), "Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference", publicado por VCR Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Los términos en singular "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" se pretende que incluya "y" a menos que el contexto

indique claramente lo contrario. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayos de esta divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura, "e.g", se deriva del Latín *exempli gratia*, y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por tanto, la abreviatura "e.g" es sinónimo al término "por ejemplo".

"Proteína de la familia C1q" se refiere a un miembro de la familia C1q. Proteínas de la familia C1q a modo de ejemplo incluyen, aunque sin limitación, C11, Acrp30 e HIB27. Se da preferencia a Acrp30. Como las colectinas, los miembros de la familia C1q tienen 2 o más "brazos" tipo colágeno, triméricos que proporcionan las estructuras multivalentes de estas moléculas. Se divulgan proteínas de la familia C1q como un armazón de multimerización reemplazando sus dominios de "C1q" de extremos C-terminal con una unión del receptor de TNFSF tal como el ECD de un ligando TNFSF.

"Colectina" se refiere a un miembro de la familia de la colectina. Véase URL <http://en.wikipedia.org/wiki/Collectin> para un listado de colectinas y los nombres de sus genes. Incluyen surfactante pulmonar A, surfactante pulmonar D, congulinina, colectina-43, proteína de unión a manosa MBL1 o MBL2 y otras. Se da preferencia a la proteína surfactante D (alternativamente abreviada como SP-D o SPD). Todas las colectinas tienen dos o más "brazos" tipo colágeno triméricos unidos en el centro en un "nodo" y partiendo hacia fuera para mostrar sus extremos C-terminales. Cada colectina tiene un dominio de extremo C-terminal que generalmente se une a un carbohidrato. Cuando se usa como un armazón de multimerización en la presente invención, cada colectina está producida sin el extremo C-terminal natural y en su lugar se coloca allí un dominio de unión a receptor de ECD de TNFSF. Se da preferencia a la proteína surfactante D que tiene cuatro brazos triméricos que finalizan en un extremo C-terminal.

"Receptor de TNFSF completo" es un término usado en el presente documento en distinción marcada a una cadena polipeptídica sencilla con frecuencia referida como una proteína receptor de TNFSF (véase URL <http://www.genenames.org/genefamilies/TNFRSF> para un listado de receptores de TNFSF (también llamados TNFRSF) y los nombres de sus genes. Las secuencias de nucleótidos y peptídicas de las cadenas polipeptídicas del receptor de TNFSF sencillas están enumeradas en GenBank, SwissProt, y otras bases de datos. Sin embargo, en la actualidad, las cadenas polipeptídicas del receptor de TNFSF sencillas no se encuentran aisladamente sobre la superficie de las células. En cambio, dos o más cadenas del receptor de TNFSF se localizan conjuntamente o están ligadas. Como ejemplo, el receptor Fas (CD95) para el ligando de Fas (FasL) se mantiene unido en ausencia de FasL por sus "dominios de asociación a pre-ligando" o PLAD N-terminales (Siegel et al., *Science*. 2000;288(5475):2.351-4). De manera similar, hay un dominio en la región extracelular de CD40 que mantiene este receptor unido como 2 o más cadenas (Smulski et al., *J. Biol. Chem.* 2013). Por consiguiente, la estimulación de los receptores de TNFSF generalmente no implican simplemente juntar 2 o más cadenas del receptor. Cuando el ligando no se une al receptor, el modelo por ordenador sugiere que un trímero del ligando ocupe tres cadenas del receptor (Bajorath et al., *Biochemistry*. 1995;34(31):9.884-92). Por tanto, esta aplicación usa el término "receptor de TNFSF completo" para indicar que la unión a un receptor de TNFSF implica la unión a 2 o preferiblemente 3 cadenas proteicas del receptor.

"Sistema inmune" se refiere a linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, células dendríticas, monocitos, y macrófagos y los tejidos especializados que los contienen. Los ganglios linfáticos, el sistema linfático y el bazo son estructuras físicas que albergan muchas de las células del sistema inmune. Además, otras células del sistema inmune se encuentran en los tejidos no linfoides y en la sangre. Una característica del sistema inmune es que responde a una primera exposición a un antígeno (respuesta primaria) en un modo fijado pero, luego, responde más fuertemente y más rápidamente a una segunda exposición de un antígeno (respuesta secundaria), lo cual es una manifestación de la memoria inmunológica. El sistema inmune responde a agentes infecciosos y cáncer produciendo células y moléculas efectoras que matan el agente infeccioso responsable o las células cancerosas. Entre las células que matan los atacantes son los linfocitos T incluyendo linfocitos T CD4+ y CD8+. Los linfocitos B producen anticuerpos que pueden neutralizar la infectividad de muchos agentes infecciosos. Los linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas pueden producir interferones que interfieren con la replicación de ciertos virus.

"Armazón de multimerización" se refiere a una estructura molecular que concede a la molécula dentro de la cual se incorpora una estructura global que está ligada operativamente a dos o más dominios de unión de receptor de TNFSF, de manera que el contacto con la molécula multimerizada conduce a agrupación del receptor de TNFSF completo en la membrana de una célula que responde y de ese modo activa algo o todo el potencial funcional de la célula que responde. Un concepto clave de la presente invención es que se necesita una forma de muchos trímeros de un ligando TNFSF para estimular una célula que responde portadora del receptor. Por ejemplo, estudios estructurales de la interacción GITRL/GITR indican que se necesitan dos trímeros de GITRL localizados cerca para unir o "agrupar" dos receptores GITR completos (3 cadenas de GITR cada uno) (Zhou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(14):5.465-70). Un armazón de multimerización es una estructura molecular que proporciona esta localización cercana de 2 o más uniones de receptor de TNFSF, generalmente 2 o más dominios extracelulares (ECD) del ligando TNFSF. En la presente invención, las partes de colectinas tales como SPD o se usan para producir cadenas polipeptídicas sencillas que se autoensamblan en los armazones de multimerización. Los

armazones de multimerización de la invención que tienen "brazos" capaces de ligarse operativamente a trímeros de ECD de TNFSF. Se contemplan realizaciones alternativas, tales como armazón de multimerización que se ligan operativamente a anticuerpos de cadena sencilla que se unen a un receptor de TNFSF.

5 "Ligado operativamente" se refiere a un método de unión de dos moléculas. Para polipéptidos, esto es preferiblemente por un enlace peptídico, generalmente conseguido construyendo un molde de ADN o ARN que codifica la proteína de fusión ligada operativamente y, a continuación, expresando el ADN o ARN en una célula o por un método *in vitro*. En algún caso, los agentes de entrecruzamiento químicos se pueden usar para construir formas multiméricas de agentes de unión a receptor de TNFSF como se describe en el documento US 6.482.411 B1.

10 "TNFSF" se refiere a un ligando en la Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Véase URL <http://www.genenames.org/genefamilies/TNFSF> para un listado de TNFSF y los nombres de sus genes. Los TNFSF se producen como moléculas de membrana tipo II triméricas significando que su extremo N-terminal apunta hacia dentro de la célula y su extremo C-terminal es extracelular, lo cual es lo opuesto de la mayoría de las proteínas de superficie. Esto hace estas proteínas muy desafiantes para la modificación por ingeniería usando estrategias de proteína de fusión tradicionales.

15 "Aglutinante del receptor de TNFSF" se refiere a un fragmento molecular que se une a un receptor de TNFSF. Aglutinantes del receptor de TNFSF a modo de ejemplo (o dominios de unión) incluyen el dominio extracelular (ECD) de una molécula trimérica de TNFSF o la parte de unión a receptor de un anticuerpo que reconoce un receptor de TNFSF. Para una parte de unión a receptor de un anticuerpo, se da preferencia a construcciones de anticuerpo de cadena sencilla (Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012:980250. PMID: 3312285). Miembros de TNFSF a modo de ejemplo cuyos dominios extracelulares se pueden usar como aglutinantes del receptor de TNFSF incluyen CD40L (TNFSF5), CD27L (TNFSF7), CD137L (TNFSF9), OX40L (TNFSF4), GITRL, 4-1BBL, RANKL, LIGHT, CD70, y BAFF.

20 "Antígenos tumorales" se refiere a proteínas, carbohidratos, o lípidos encontrados sobre las células tumorales contra las cuales el sistema inmune puede lanzar un ataque. Para una discusión de antígenos tumorales, véase Kvistborg et al. (*Curr. Opinion Immunol.* 25:284-290, 2013) y Cheever et al. (*Clin. Cancer Res.* 15, 5.323-5.337, 2009). También se contemplan como antígenos tumorales péptidos antigénicos deducidos de la secuenciación de próxima generación del ARN o ADN de tumores, incluyendo la secuenciación de exoma (Segal et al., *Cancer Res.* 2008;68(3):889-92; Castle et al., *Cancer Res.* 2012;72(5):1.081-91).

35 Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Esta invención describe, entre otros, moléculas que comprenden proteínas de fusión y los ácidos nucleicos que las codifican en los que los siguientes dominios codificantes de proteína están ligados operativamente en el siguiente orden: un armazón formado por una parte de una colectina, un antígeno (contenido dentro del armazón), y el dominio extracelular de un ligando de la superfamilia de TNF. Una proteína de fusión a modo de ejemplo o ácido nucleico que la codifica comprende el antígeno, la proteína surfactante D (SPD) sin su dominio receptor de carbohidrato, y el dominio extracelular del ligando de CD40. También se describe inmunoglobina (Ig), Acnp30, un motivo de multimerización GCN4, o proteínas similares como armazones para el ligando de CD40, otros miembros de los ligandos de la superfamilia de TNF, u otros ligandos o receptores, incluyendo gp96 o moléculas de MHC. En una realización, las moléculas, composiciones y/o proteínas de fusión de la invención no contienen partes de avidina o estreptavidina.

50 Estas proteínas de fusión se diseñan para permitir dirigir las células dendríticas, macrófagos, linfocitos B u otras células presentadoras de antígeno al antígeno así como proporcionar señales de activación necesarias para inducir la maduración de la célula dendrítica dirigida, macrófago, linfocito B u otra célula presentadora de antígeno. Esto da como resultado la presentación óptima del antígeno al sistema inmune, y una respuesta inmune potente en el individuo tratado, o bien mediado por linfocito T o mediado por anticuerpo.

Más detalladamente, la presente invención proporciona una solución para el problema de vacunación frente a agentes infecciosos y para la inmunoterapia del cáncer. Proporciona una manera de ligar un adyuvante en la superfamilia de TNF (TNFSF) a un antígeno de modo que el adyuvante TNFSF y el antígeno lleguen a la misma célula a la vez. En el caso de respuestas del linfocito T CD8+, es importante proporcionar antígeno a células dendríticas (DC) y otras células presentadoras de antígeno de modo que el antígeno proteico se procese por escisión en péptidos y se cargue sobre MHC-I para la presentación cruzada sobre la superficie celular como complejos pMHC-I que en turnos estimulan el receptor del linfocito T (Señal 1). Es preferible dirigir el antígeno al receptor CD40 sobre DC puesto que esto da como resultado la presentación cruzada superior por un gran número de subtipos de DC (Chatterjee et al., *Blood.* 2012;120(10):2.011-20). Además, es importante activar la DC que está presentando antígeno para que las DC presenten el linfocito T específico a antígeno con señales accesorias (Señal 2 y Señal 3). Si las DC muestran solamente pMHC-I y no se activan para presentar otras señales, entonces el linfocito T CD8+ específico a antígeno resultante llega a ser tolerante y carece de funciones eficaces protectoras (Bonifaz et al., *J. Exp. Med.* 2002;196(12):1.627-38. PMID: 2196060). La estimulación del receptor CD40 sobre las DC activa las DC para proporcionar estas otras señales y conduce a respuestas profundas del linfocito T CD8+

(Bonifaz et al., *J. Exp. Med.* 2004;199(6):815-24). Por tanto, la presente invención proporciona una vacuna fuerte para los linfocitos T CD8+ fusionando el antígeno con las formas multiméricas previamente descritas de CD40L formado por el dominio extracelular (ECD) de CD40L fusionado a los armazones de multimerización empleando partes de proteína surfactante D (SPD) o Acrp30.

5 La activación de las DC y otras APC se realiza mejor por una forma de muchos trímeros de CD40L en la que 2 o más trímeros son necesarios para agrupar y de ese modo activar los receptores CD40 sobre las DC, como se representa en la Figura 1.

10 El nuevo conocimiento de los anticuerpos anti-receptor de TNFSF agonísticos se muestra en la Figura 2. En este caso, el anticuerpo primero se une a una célula adyacente por su parte Fc que se une a los receptores de Fc sobre el tipo de célula adyacente (Li y Ravetch, *Science*. 2011;333(6045):1.030-4. PMID: 3164589; Wilson et al., *Cancer Cell*. 2011;19(1):101-13; White et al., *J. Immunol.* 2011;187(4):1.754-63). Esto conduce a dos problemas: (1) las DC y otras APC que no son adyacentes a una célula portadora de FcR no se pueden estimular; y (2) si el anticuerpo se une a ciertos FcR, entonces es posible que la célula adyacente matará la DC por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o fagocitosis de la DC y la eliminará (Bulliard et al., *J. Exp. Med.* 2013;210(9):1.685-93. PMID: 3754864). El fenómeno anterior puede explicar el agotamiento grave de los linfocitos B CD40 cuando se ensayó un anticuerpo frente a CD40 en seres humanos con cáncer (Vonderheide et al., *J. Clin. Oncol.* 2007;25(7):876-83). Estas consideraciones establecen la fase para una manera nueva y mejor de proporcionar estimulación de tanto antígeno como CD40 para DC y otras APC.

25 Otro planteamiento se tomó de Xiang et al. (*J. Immunol.* 2001;167(8):4.560-5) quienes produjeron una proteína de fusión de antígeno tumoral (CEA) unida al extremo C-terminal de CD40L (US 7.279.464 B2; US 6.923.958 B2). Sin embargo, debido a que el resto de CD40L no está localizado en el extremo de la proteína, posiblemente se podría haber alterado la unión del ligando al receptor CD40. No se presentaron datos para descartar este asunto, pero la eficacia de la vacuna era modesta.

30 En un planteamiento relacionado, Zhang et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(25):15.101-6) fusionó un antígeno tumoral sobre el extremo N-terminal del dominio extracelular de CD40L y administró esta construcción usando un vector de adenovirus. En este caso, el diseño molecular permitió que CD40L se uniera de forma perfecta a su receptor. Aun así, la eficacia de esta vacuna era relativamente modesta. Esto se espera cuando se usa una forma de 1 trímero de CD40L en lugar de una construcción multitrímica de agrupación al receptor tal como SPD-Gag-CD40L.

35 Otro planteamiento se tomó de Shirwan et al. quien produjo una proteína de fusión entre la región "núcleo" de la estreptavidina proteína bacteriana (CSA) y el dominio extracelular de CD40L o 4-1BBL, como se describe en el documento US 8.017.582 B2 y en Schabowsky et al., *Exp. Mol. Pathol.* 86:198-207, 2009. En este caso, la mitad N-terminal de las proteínas de fusión consistían en CSA en la que la estreptavidina está ensamblada de manera natural en una molécula de 4 cadenas. El multimerismo reúne los ECD covalentemente ligados para CD40L o 4-1BBL. Puesto que la estreptavidina se une a biotina y puesto que las proteínas se pueden someter a biotilación fácilmente, era posible someter a biotilación antígenos tales como ovalbúmina (OVA) de pollo o los antígenos tumorales E7 de VPH que los permite unirse no covalentemente a CSA-CD40L o CSA-4-1BBL. Sin embargo, para ser activo, CD40L se debe usar en una forma multimérica que agrupa dos o más receptores CD40, como se representa en la Figura 1 de la presente solicitud. La inactividad relativa de una forma de trímero único de CD40L fue demostrada por Haswell et al. (*Eur. J. Immunol.* 31:3094-3100, 2001; véase la Figura 3). Por el contrario, el CSA-CD40L forma un trímero único de CD40L como se representan en la Figura 1B de Schabowsky et al., lo cual no es deseable desde la perspectiva de la estimulación eficaz del receptor. Además, la interacción biotina-estreptavidina en el diseño de Shirwan et al. es no covalente. El antígeno se ha sometido a biotilación lo cual, a continuación, le permite unirse al resto de estreptavidina en el complejo CSA-CD40L. Sin embargo, *in vivo*, hay biotina libre presente en los fluidos biológicos que pueden interferir con la formación del complejo CSA-CD40L/biotina-antígeno o inducir su disociación. Por el contrario, la presente invención utiliza el antígeno que se ha unido covalentemente a CD40L gracias a los enlaces peptídicos que componen la proteína de fusión SPD-antígeno-CD40L y, por tanto, la proteína no es susceptible a la disociación en presencia de biotina libre. Otra diferencia importante es que CSA es una proteína xenogénica de bacteria que es altamente antigénica en seres humanos y otros vertebrados (Meyer et al. *Protein Science* 2001;10(3):491-503; Yumura et al., *Protein Science* 2013;22(2):213-21). Por el contrario, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden construir principalmente con proteínas no xenogénicas de modo que el único componente de proteína extraño principal es el antígeno seleccionado para la inmunización. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el armazón de multimerización y la pluralidad del aglutinante del receptor de TNFSF no contiene ninguna parte xenogénica.

60 Otro sistema para producir formas de muchos trímeros de OX40L fue descrito por Weinberg et al. en el documento US 7.959.925 B2. En este sistema, las proteínas de fusión se producen usando un dominio de Fc de inmunoglobulina N-terminal que se somete a dimerización de forma natural por enlaces disulfuro intercadena. Cuando esto se une a un dominio de trimerización que a continuación se une a un dominio extracelular de TNFSF, da como resultado lo que se describe como un hexámero o "dímero de trímeros". SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 divulgan una proteína de fusión que proporciona una forma de 2 trímeros de APRIL fusionada con la proteína de Env

de VIH-1 lo cual se espera que induzca una fuerte respuesta de anticuerpo a VIH-1. El experto en la técnica verá fácilmente cómo el dominio extracelular de APRIL se podría reemplazar por el dominio extracelular de cualquier otro ligando TNFSF y también cómo el antígeno de Env de VIH-1 se podría reemplazar por otros antígenos de interés. Además, el experto en la técnica podría concebir otros dominios de dimerización (tales como los de CD4 o CD8) u otros dominios de trimerización (tales como los de GCN4, TRAF2, trombospondina 1, Matrilina-4, CMP (Matrilina-I), HSF1 o cobulina, como se describe en el documento US 7.959.925 B2) o el dominio de trimerización de la región "cuello" (*neck*) de SPD en el documento US 6.190.886.

Como se describe en la presente solicitud, se puede producir una vacuna sorprendentemente activa incorporando un antígeno con los brazos de SPD en la construcción SPD-CD40L de 4 trímeros que se desarrollaron previamente por los inventores y se muestran en las Figuras 3 y 4. Con propósitos de demostración, el antígeno Gag de VIH-1 se insertó en la región codificante para el brazo tipo colágeno de SPD como se muestra en las SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 y se representa en la Figura 5. Esta proteína de fusión usa el "brazo" de SPD natural que se ha mostrado que es de 46 mm de longitud en los estudios electromicroscópicos de sombra. La estructura helicoidal tipo colágeno y los resultados de la clase Gly-Xaa-Yaa tipo colágeno se repite en la proteína que cuenta con 59 repeticiones en el brazo. Para la presente invención, la longitud de este brazo se puede variar de dos maneras: (1) Se pueden introducir deleciones de aminoácidos que truncan un motivo Gly-Xaa-Yaa; y (2) se puede insertar el antígeno variablemente a lo largo de la longitud del brazo. Considerando los 177 aminoácidos en las 59 repeticiones tipo colágeno, el dominio de antígeno se puede colocar desde 10 a 177 aminoácidos más de extremo C-terminal desde el nodo, o preferiblemente desde 20 a 140 aminoácidos más de extremo C-terminal desde el nodo, o más preferiblemente desde 40 a 120 aminoácidos más de extremo C-terminal desde el nodo. Asimismo, el dominio de antígeno puede estar situado más cerca o más lejos del dominio extracelular (ECD) de TNFSF. Por ejemplo, el dominio de antígeno podría estar desde 0 a 167 aminoácidos más N-terminal desde el EDC de TNFSF, o más preferiblemente desde 40 a 120 aminoácidos más N-terminal desde el EDC. A modo de ejemplos no limitantes, las secuencias SEQ ID 13 y SEQ ID 14 muestran una proteína de fusión en la que el dominio de antígeno está desplazado en 10 posiciones de aminoácido dentro del brazo de SPD. Asimismo, las SEQ ID NO 17 y SEQ ID NO 18 muestran una proteína de fusión en la que se han suprimido 20 aminoácidos del brazo de SPD. Con esto como guía, el experto sabrá que no es crucial exactamente dónde el dominio de antígeno debería estar situado en el brazo de SPD.

Como se ha descrito previamente por los inventores, la formas de 2 trímeros de ligandos TNFSF se pueden producir usando Acrp30. Las figuras 3 y 4 muestran el diseño y la eficacia del adyuvante de vacuna de una proteína de fusión Acrp30-CD40L. Esta molécula tiene dos brazos tipo colágeno. Por consiguiente, se divulga colocar un dominio de antígeno dentro de los brazos de Acrp30 como se muestra en las SEQ ID 3 y SEQ ID 4 que colocan el antígeno de Env de VIH-1 dentro de los brazos de una proteína de fusión Acrp30-BAFF. Se podrían producir proteínas de fusión análogas a partir de otras proteínas de fusión de colectina además de SPD-TNFSF y de otras moléculas de la familia C1q además de Acrp3-TNFSF.

Una característica de estas proteínas de fusión es que se pueden producir fácilmente usando las secuencias de colectina naturales y las secuencias de TNFSF de diversos organismos. Es preferible usar las secuencias codificantes murinas para estudios en ratones, las secuencias codificantes de macaco para estudios en macacos, las secuencias codificantes humanas para su uso en seres humanos, etc. Como ejemplos no limitantes, las secuencias mostradas proporcionan proteína de fusión producida usando o bien secuencias murinas o humanas. Por tanto, los usos de la vacuna animal se contemplan específicamente como un uso de la presente invención.

En estos casos, el antígeno se introdujo en formas de muchos trímeros de TNFSF mediante métodos de ingeniería genética estándar familiares al experto en la técnica. Tales proteína de fusión se pueden producir ligando segmentos de genes o, más preferentemente, ordenando una síntesis personalizada de un proveedor comercial (por ejemplo, DNA2.0, Genset, Genewiz, y otros proveedores). En otros casos, es posible preparar péptidos antigénicos y trímeros de TNFSF por separado y, a continuación, ligarlos por métodos químicos. Los reactivos de unión y las estrategias de síntesis que se pueden usar se describen en el documento US 6.482.411 B1.

Hay una amplia selección de antígenos de enfermedad infecciosa, dependiendo de la especie en necesidad de vacunación. Sin limitación, estos se pueden seleccionar de la siguiente lista de patógenos causantes de enfermedad:

Virus tales como influenza A y B, parainfluenza, poxvirus, virus del ébola, hepadnavirus, virus filiforme tal como virus de marburg, virus de la fiebre del dengue, influenza A y B, virus sincitial respiratorio, sarampión (virus de la rubéola), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), varicela-zóster, herpes simplex I y 2, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus JC, rbdovirus, rotavirus, rinovirus, adenovirus, ortomixovirus, virus del papiloma, parvovirus, picornavirus, poliovirus, paperas, rabia, reovirus, rubéola, togavirus, retrovirus, coxsackievirus, virus de la encefalitis equina, encefalitis japonesa, fiebre amarilla, fiebre del Valle del Rift, virus de la hepatitis A, B, C, D y E, hantavirus, coronavirus (incluyendo SARS y MERS), y similares;

agentes microbianos tales como especies de *Borrelia*, *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Camphylobacter jejuni*, especies de *Chlamydia*, *Chlamydial psittaci*, *Chlamydial trachomatis*, especies de

- 5 *Clostridium*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, especies de *Coxiella*, especies de *Enterococcus*, especies de *Erichia* *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, especies de *Haemophilus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, especies de *Lactobacillus*, una especie de *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Mycobacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, especies de *Mycoplasma*, *Mycoplasma pneumoniae*, especies de *Neisseria*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, especies de *Pneumococcus*, especies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Salmonella*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enterica*, especies de *Rickettsia*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, especies de *Shigella*, especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mutans*, especies de *Treponema*, *Treponema pallidum*, una especie de *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, y similares;

Ejemplos de secuencia

- 15 Las siguientes secuencias describen además ciertas realizaciones de la invención:

<160> NÚMERO DE SEQ ID NOS: 18 <210> SEQ ID NO 1

<211> Longitud: 2913

<212> TIPO: ADN

- 20 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con Gag de VIH-1 y el dominio extracelular de CD40L murino

muSP-D-GAG-muSP-D-muCD40L

- 25 Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de SP-D murina (dominio tipo colágeno)

Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de Gag de VIH-1

Secuencia en cursiva: Secuencia de CD40L murino (dominio extracelular)

**ATGCTGCCCTTTCTCTCCATGCTTGTCTTGCTTGTACAGCCCCTGGGAAATCTGGGAGCAGAAAT
 GAAGAGCCTCTCGCAGAGATCAGTACCCAACACCTGCACCCTAGTCATGTGTAGCCCAACAGAGA
 ATGGCCTGCCTGGTCTGATGGACGGGATGGGAGAGAAGGTCACCGGGGTGAGAAGGGTGATCCA
 GGTTCGCCAGGACCTATGGGGCTCTCAGGGTTGCAGGGCCCTACAGGTCAGTTGGACCCAAAGG
 AGAGAATGGCTCTGCTGGCGAACCTGGACCAAAGGGAGAACGTGGACTAAGTGAATGGGAGCCA
 GGGCCAGCGTGTCTGGGGGCGAGCTGGACAGGTGGGAGAAGATTAGGCTGAGGCCCGGAGGA
 AAGAAGAAGTACAACTGAAACACATCGTGTGGGCCTCCCGGGAGCTGGAACGGTTCGCCGTGAA
 TCCTGGGCTGCTGGAGACCTCTGAGGGCTGCAGACAGATCCTGGGACAGCTGCAGCCTAGCCTGC
 AGACCGGAAGCGAGGAGCTGAGGTCTCTGTACAACACCGTGGCCACACTGTACTGCGTGCACCAG
 CGGATTGAGGTGAAGGATACCAAGGAAGCCCTGGAGAAGATTGAGGAAGAGCAGAATAAGTCCAA
 GAAGAAAGCCCAGCAGGCCGCCGCCGACACAGGAAATAGTCCCAGGTGTCTCAGAACTACCCCA
 TCGTGCAGAACCTGCAGGGACAGATGGTGCACCAGGCCATCAGCCCCCGGACCCTGAACGCCCTGG
 GTGAAGGTGGTGAAGAGAAAGCCTTCAGCCCAGAAGTGATCCCCATGTTTCAGCGCCCTGAGCGA
 AGGGGCCACCCACAGGACCTGAATACAATGCTGAATACAGTGGGCGGCCACCAGGCCGCCATGC
 AGATGCTGAAGGAGACCATTAACGAGGAGGCCGCCGAGTGGGATAGGCTGCACCCAGTGCACGCC
 GGGCCCATCGCCCCAGGGCAGATGAGGGAGCCACGGGGCTCTGACATCGCCGGCACCACCTCTAC
 CCTGCAGGAGCAGATCGGCTGGATGACCAATAACCCACCTATTCCCCTGGGAGAAATCTACAAAA
 GGTGGATTATCCTGGGGCTGAACAAGATCGTGAGAATGTACTCCCCAACATCCATTCTGGACATC
 CGGCAGGGCCCAAAGGAACCCTTTAGAGACTACGTGGATAGGTTCTACAAAACCCTGCGCGCCGA
 GCAGGCCCTCCAGGAGGTGAAGAACTGGATGACCGAGACACTGCTGGTGCAGAATGCCAACCCAG
 ACTGTAAGACCATTCTGAAGGCCCTGGGACCAGCCGCCACCCTGGAGGAAATGATGACAGCCTGC
 CAGGGGTGGGCGGACC CGGCCACAAGGCCCGCGTGTGGCCGAGGCCATGTCCCAGGTGACAAA
 TTCCGCCACCATCATGATGCAGCGCGGAAATTTTCGGAATCAGCGCAAAAACAGTGAAATGCTTCA
 ATTGCGGGAAGGAGGGCCACATCGCCAAGAATTGCAGAGCCCCAAGGAAGAAGGGCTGCTGGAAG
 TGCGGAAAGGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGCGCCAGGCCAATTTCCCTGGGCAAGAT
 CTGGCCATCCCACAAGGGGCGGCCTGGAAACTTCCCTGCAGAGCCGGCCCGAACCCACAGCCCCC
 CTGAAGAATCCTTCCGGTTCGGAGAGGAAACAACCACACCAGCCAGAAGCAGGAGCCTATCGAC**

**AAGGAACGTGTACCCACTGGCCAGCCTGAGAAGCCTGTTTCGGCAACGATCCAAGCAGCCAGCCTCC
 AGGACTTCCAGGTATTCTTGGTCCAGCTGGGAAAGAAGTCCCTCTGGGAAGCAGGGGAACATAG
 GACCTCAAGGCAAACCAGGTCTTAAAGGAGAGGCTGGGCCCAAAGGAGAAGTAGGTGCTCCTGGC
 ATGCAAGGATCTACAGGGGCAAAGGCTCCACAGGCCCAAAGGAGAAAGAGGTGCCCTGGTGT
 GCAAGGAGCCCAGGGAATGCTGGAGCAGCAGGACCTGCCGGACCTGCCGGTCCACAGGGAGCTC
 CAGGTTCCAGGGGGCCCCAGGACTCAAGGGGGACAGAGGTGTTCTTGGAGACAGAGGAATCAA
 GGTGAAAGCGGGCTTCCAGACAGTGTCTGCTCTGAGGCAGCAGATGGAGGCCCTAAAAGGAAA
 ACTACAGCGTCTAGAGGTTGCCTTCTCCACTATCAGAAAGCTGCATTGTTCCCTGATGGCCATAGAA
 GATTGGATAAGGTGCAAGAGGAAGTAAACCTTCATGAAGATTTTGTATTCATAAAAAAGCTAAAG
 AGATGCAACAAAGGAGAAGGATCTTTATCCTTGTGAACTGTGAGGAGATGAGAAGGCAATTTGA
 AGACCTTGTCAAGGATATAACGTTAAACAAGAAGAGAAAAAAGAAAAACAGCTTTGAAATGCAAA
 GAGGTGATGAGGATCCTCAAATTGCAGCACACGTTGTAAGCGAAGCCAACAGTAATGCAGCATCC
 GTTCTACAGTGGGCCAAGAAAGGATATTATACCATGAAAAGCAACTTGGTAATGCTTGAAAATGG
 GAAACAGCTGACGGTTAAAAGAGAAGGACTCTATTATGTCTACACTCAAGTCACCTTCTGCTCTA
 ATCGGGAGCCTTCGAGTCAACGCCCATTCATCGTCCGCCTCTGGCTGAAGCCAGCATTGGATCT
 GAGAGAATCTTACTCAAGGCGGCAAATACCCACAGTTCCTCCCAGCTTTGCGAGCAGCAGTCTGT
 TCACTTGGGCGGAGTGTGTTGAATTACAAGCTGGTGTCTCTGTGTTTGTCAACGTGACTGAAGCAA
 GCCAAGTGATCCACAGAGTTGGCTTCTCATCTTTTGGCTTACTCAAACCTCTGA**

- <210> SEQ ID NO 2
- <211> Longitud: 970
- 5 <212> TIPO: PRT
- <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
- <220> CARACTERÍSTICA:
- <223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con Gag de VIH-1 y el dominio extracelular de CD40L murino

10

ES 2 775 278 T3

MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDGRDREGPRGEKGD
GLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKEGNSAGEPGPKGERGLSGMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGG
KKKYKLLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQ
RIEVKDTKEALEKIEEEEQNKSKKKAQQAAADTGNSSQVSNYPVQNLQGMVHQAI SPRTLNAW
VKVVEEKAFSPEVIMPFSALSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHA
GPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWIIILGLNKIVRMYSPTSILDI
RQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTAC
QGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIMMQRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHIKNCRAPRKKGCWK
CGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFQSRPEPTAPPEESFRFGEETTTPSQKQEPID
KELYPLASLRSLFGNDPSSQPPGLPGIPGPAGKEGPGSGKQGNIGPQGKPGKGEAGPKGEVGPAG
MQGSTGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKGDGVPVGDGRIK
GESGLPDSAALRQQMEALKGKLRLEVAFVSHYQKAALFPDGHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKLLK
RCNKGEGLSLLNCEEMRRQFEDLVKDIITLNKEEKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAAS
VLQWAKKGYTMSNLVMLENGKQLTVKREGLYVYVTQVTFCSNREPSSQRPFFIVGLWLKPSIGS
ERILLKAANTHSSQLCEQQSVHLGGVFELOAGASVFNVTASQVIHRVGFSSFGLLKL

tpa-muACRP30-gp 120-muACRP30-muBAFF

<210> SEQ ID NO 3

<211> Longitud: 2784

5 <212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Secuencia señal TPA humana fusionada con ACRP30 murina fusionada con gp120 de Env de VIH-1 y el dominio extracelular de BAFF murina

10 Secuencia subrayada: Secuencia TPA humana

Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de ACRP30 murina

Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de gp120 de Env de VIH-1

Secuencia en cursiva: Secuencia de BAFF murina (dominio extracelular)

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCC
 CAGC **GAAGATGACGTTACTACAAC**TGAAGAGCTAGCTCCTGCTTTGGTCCCTCCACCCAAGGGAA
CTTGTGCAGGTTGGATGGCAGGCATCCCAGGACATCCTGGCCACAATGGCACACCAGGCCGTGAT
GGCTGGGGCAACCTGTGGGTGACCGTGTACTACGGCGTGCCCGTGTGGAAGGAGGCCAAGACCAC
 CCTGTTCTGCGCCAGCGACGCCAAGAGCTACGAGAAGGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCCACG
 CCTGCGTGCCACCGACCCCAACCCCCAGGAGATCGTGCTGGGCAACGTGACCGAGAACTTCAAC
 ATGTGGAAGAACGACATGGTGGACCAGATGCACGAGGACATCATCAGCCTGTGGGACCAGAGCCT
 GAAGCCCTGCGTGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCCTGAACTGCACCGAGGTGAACGTGACCC
 GCAACGTGAACAACAGCGTGGTGAACAACACCACCAACGTGAACAACAGCATGAACGGCGACATG
 AAGAACTGCAGCTTCAACATCACCACCGAGCTGAAGGACAAGAAGAAGACGTGTACGCCCTGTT
 CTACAAGCTGGACATCGTGAGCCTGAACGAGACCGACGACAGCGAGACCGGCAACAGCAGCAAGT
 ACTACCGCCTGATCAACTGCAACACCAGCGCCCTGACCCAGGCCTGCCCAAGGTGAGCTTCGAC
 CCCATCCCCATCCACTACTGCGCCCCCGCCGGCTACGCCATCCTGAAGTGCAACAACAAGACCCTT
 CAACGGCACCGGCCCTGCCACAACGTGAGCACCGTGCAGTGCACCCACGGCATCAAGCCCCGTGG
 TGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAGGAGGGCATCATCATCCGCAGCGAGAAC
 CTGACCAACAACGTCAAGACCATCATCGTGCACCTGAACCGCAGCATCGAGATCGTGTGCGTGCG
 CCCCCAACAACAACCCCCGCCAGAGCATCCGCATCGGCCCCGGCCAGACCTTCTACGCCACCGGCG
 ACATCATCGGCGACATCCGCCAGGCCACTGCAACATCAGCCGCACCAACTGGACCAAGACCCTG
 CGCGAGGTGCGCAACAAGCTGCGCGAGCACTTCCCCAACAAGAACATCACCTTCAAGCCCAGCAG
 CGGCGGCGACCTGGAGATCACCACCCACAGCTTCAACTGCCGCGGCGAGTTCTTCTACTGCAACA
 CCAGCGCCTGTTTACAGATCAACTACACCGAGAACAACACCGACGGCACCCCCATCACCTGCC
 TGCCGCATCCGCCAGATCATCAACATGTGGCAGGAGGTGGGCCGCGCCATGTACGCCCCCCCCAT
 CGAGGGCAACATCGCCTGCAAGAGCGACATCACCGCCTGCTGCTGGTGCAGCGACGGCGGCAGCA
 CCAACGACAGCACCAACAACAACACCGAGATCTTCCGCCCGCCGGCGGCAGATGCGCGACAAC
 TGGCGCAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGGAGATCAAGCCCCTGGGCATCGCCCCACCGA
 GGCCAAGCGCCGCTGGTGGAGCGCGAGAAGCGCGCCGTGGGCATCGGCGCCGTGTTCTCTGGGCT
 TCCTGGGCGCCGCCGAGCACCATGGGCGCCGAGCATCACCTGACCGCCAGGCCCGCCAG
 GTGCTGAGCGGCATCGTGCAGCAGCAGAGCAACCTGCTGCGCGCCATCGAGGCCAGCAGCACCT
 GCTGCAGCTGACCGTGTGGGGCATCAAGCAGCTGCAGACCCGCGTGTGGCCATCGAGCGCTACC
 TGAAGGACCAGCAGCTGCTG**AGAGATGGCACTCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAAGGAGATGCAGGT**
CTTCTTGGTCCTAAAGGGT**GAGACAGGAGATGTTGGAATGACAGGAGCTGAAGGGCCACGGGGCTT**
CCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGGAGAGCCTGGAGAAGCCGCTCAGTTGGCTGCCTTGCAAGCAG

ACCTGATGAACCTGCGCATGGAGCTGCAGAGCTACCGAGGTTTACGCAACACCAGCCGCGCGGGT
 GCTCCAGAGTTGACCGCTGGAGTCAAACCTTGACACCGGCAGCTCCTCGACCCCAACTCCAG
 CCGCGGCCACAGGAACAGACGCGCTTTCCAGGGACCAGAGGAAACAGAACAAGATGTAGACCTCT
 CAGCTCCTCCTGCACCATGCCTGCCTGGATGCCGCCATTCTCAACATGATGATAATGGAATGAAC
 CTCAGAAACATCATTCAAGACTGTCTGCAGCTGATTGCAGACAGCGACACGCCGACTATAACGAAA
 AGGAACTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCTTTAAAAGAGGAAATGCCCTGGAGGAGAAAG
 AGAACAATAATAGTGGTGGAGGCAAACAGGCTATTTCTTTCATCTACAGCCAGGTTCTATAACCGGAC
 CCCATCTTTGCTATGGGTCATGTCATCCAGAGGAAGAAAGTACACGTCTTTGGGGACGAGCTGAG
 CCTGGTGACCCTGTTCCGATGTATTGAGAAATATGCCCAAAACACTGCCCAACAATTCCTGCTACT
 CGGCTGGCATCGCGAGGCTGGAAGAAGGAGATGAGATTGAGCTTGAATTCCTCGGGAGAAATGCA
 CAGATTTACGCAACGGAGACGACACCTTCTTGGTGCCCTAAAACCTGCTGTAA

<210> SEQ ID NO 4

<211> Longitud: 927

5 <212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Secuencia señal TPA humana fusionada con

10 ACRP30 murina fusionada con gp120 de Env de VIH-1 y el dominio extracelular de BAFF murina

ES 2 775 278 T3

MDAMKRGLCCVLLLLCGAVFVSPSEDDVTTTEELAPALVPPPKGTCAGWMAGIPGHPGHNGTPGRD
GWGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKSYEKEVHNVWATHACVPTDPNPQEIVLGNVTENFN
MWKNDMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTEVNVTRNVNNSVNNNTTNVNSMNGDM
KNCSFNITTELKDKKKNVYALFYKLDIVSLNETDDSETGNSSKYYRLINCNTSALTQACPKVSFD
PIPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCHNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGLAEEGIIIRSEN
LTNNVKTIIIVHLNRSIEIVCVRPNNNTRQSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISRTNWTKTL
REVRNKLREHFPNKNITFKPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSGLFSINYTENNTDGTPIITLP
CRIRQIINMWQEVGRAMYAPPIEGNIACKSDITGLLLVVDGGSTNDSTNNNTEIFRPAGGDMRDN
WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTEAKRRVVEREKRAVIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTAQARQ
VLSGIVQQSNLLRAIEAQQLLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLKDQQLLRDGTPEKGEKGDAG
LLGPKGETGDVGMTGAEGPRGFPPTPGRKGEPEAAQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAG
APELTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGRNRRAFQGPETE QDVDLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMN
LRNIIQDCLQLIADSDTPTIRKGTYTFVPWLLSFKRGNAL EEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTD
PIFAMGHVIQRKKVHVFGDEL SLVTLFRCIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENA
QISRNGDDTFFGALKLL

muSP-D-gp100-muSP-D-muCD40L

<210> SEQ ID NO 5

<211> Longitud: 3129

5 <212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con gp100 humana y el dominio extracelular de CD40L murino

10 Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de SP-D murina (dominio tipo colágeno)

Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia en cursiva de la secuencia de gp100 humana:

Secuencia de CD40L murino (dominio extracelular)

**ATGCTGCCCTTTCTCTCCATGCTTGTCTTGCTTGTACAGCCCCTGGGAAATCTGGGAGCAGAAAT
 GAAGAGCCTCTCGCAGAGATCAGTACCCAACACCTGCACCCTAGTCATGTGTAGCCCAACAGAGA
 ATGGCCTGCCTGGTTCGTGATGGACGGGATGGGAGAGAAGGTCCACGGGGTGAGAAGGGTGATCCA
 GGTTTGCCAGGACCTATGGGGCTCTCAGGGTTGCAGGGCCCTACAGGTCCAGTTGGACCCAAAGG
 AGAGAATGGCTCTGCTGGCGAACCTGGACCAAAGGGAGAACGTGGACTAAGTGGAAAAGTACCCA
 GAAACCAGGACTGGCTTGGTGTCTCAAGGCAACTCAGAACCAAAGCCTGGAACAGGCAGCTGTAT
 CCAGAGTGGACAGAAGCCCAGAGACTTGACTGCTGGAGAGGTGGTCAAGTGTCCCTCAAGGTCAG
 TAATGATGGGCCTACACTGATTGGTGCAAATGCCTCCTTCTCTATTGCCTTGAACCTCCCTGGAA
 GCCAAAAGGTATTGCCAGATGGGCAGGTTATCTGGGTCAACAATACCATCATCAATGGGAGCCAG
 GTGTGGGGAGGACAGCCAGTGTATCCCCAGGAACTGACGATGCCTGCATCTTCCCTGATGGTGG
 ACCTTGCCCATCTGGCTCTTGGTCTCAGAAGAGAAGCTTTGTTTATGTCTGGAAGACCTGGGGCC
 AATACTGGCAAGTTCTAGGGGGCCAGTGTCTGGGCTGAGCATTGGGACAGGCAGGGCAATGCTG
 GGCACACACACCATGGAAGTACTGTCTACCATCGCCGGGGATCCCGGAGCTATGTGCCTCTTGC
 TCATTCCAGCTCAGCCTTCACCATTACTGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGAGCGTGTCCAGTTGC
 GGGCCTTGGATGGAGGGAACAAGCACTTCCCTGAGAAATCAGCCTCTGACCTTTGCCCTCCAGCTC
 CATGACCCCAGTGGCTATCTGGCTGAAGCTGACCTCTCCTACACCTGGGACTTTGGAGACAGTAG
 TGGAACCCCTGATCTCTCGGGCACTTGTGGTCACTCATACTTACCTGGAGCCTGGCCCAGTCACTG
 CCCAGGTGGTCCCTGCAGGCTGCCATTCTCTCACCTCCTGTGGCTCCTCCCCAGTTCCAGGCACC
 ACAGATGGGCACAGGCCAACTGCAGAGGCCCTAACACCACAGCTGGCCAAGTGCCTACTACAGA
 AGTTGTGGGTACTACACCTGGTCAGGCGCCAACCTGCAGAGCCCTCTGGAACACATCTGTGCAGG
 TGCCAACCACTGAAGTCATAAGCACTGCACCTGTGCAGATGCCAACTGCAGAGAGCACAGGTATG
 ACACCTGAGAAGGTGCCAGTTTCAGAGGTTCATGGGTACCACACTGGCAGAGATGTCAACTCCAGA
 GGCTACAGGTATGACACCTGCAGAGGTATCAATTGTGGTGTCTTCTGGAACACAGCTGCACAGG
 TAACAACCTACAGAGTGGGTGGAGACCACAGCTAGAGAGCTACCTATCCCTGAGCCTGAAGTCCA
 GATGCCAGCTCAATCATGTCTACGAAAGTATTACAGGTTCCCTGGGCCCCCTGCTGGATGGTAC
 AGCCACCTTAAGGCTGGTGAAGAGACAAGTCCCCCTGGATTGTGTCTGTATCGATATGGTTCCT
 TTTCCGTACCCTGGACATTGTCCAGGGTATTGAAAGTGCCGAGATCCTGCAGGCTGTGCCGTCC
 GGTGAGGGGGATGCATTTGAGCTGACTGTGTCTGCCAAGGCGGGCTGCCAAGGAAGCCTGCAT
 GGAGATCTCATCGCCAGGGTCCAGCCCCCTGCCAGCGGCTGTGCCAGCCTGTGTACCCAGCC
 CAGCCTGCCAGCTGGTCTGCACCAGATACTGAAGGGTGGCTCGGGGACATACTGCCTCAATGTG
 TCTCTGGCTGATACCAACAGCCTGGCAGTGGTCCAGCACCAGCTTATCATGCCTGGTCAAGAAGC
 AGGCCTTGGGCAGGTT**CCTCCAGGACTTCCAGGTATTCTGGTCCAGCTGGGAAAGAAGTCCCT
 CTGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAAGGCAAACCAGGTCTAAAGGAGAGGCTGGGCCAAA
 GGAGAAGTAGGTGCTCCTGGCATGCAAGGATCTACAGGGGCAAAGGCTCCACAGGCCCAAAGGG
 AGAAAGAGGTGCCCTGGTGTGCAAGGAGCCCAGGGAATGCTGGAGCAGCAGGACCTGCCGGAC
 CTGCCGGTCCACAGGGAGCTCCAGGTTCCAGGGGGCCCCAGGACTCAAGGGGGACAGAGGTGTT
 CCTGGAGACAGAGGAATCAAAGGTGAAAAGCGGGCTTCAGACAGTGTGCTCTGAGGCAGCAGAT
 GGAGGCCTTAAAAGGAAAACCTACAGCGTCTAGAGGTTGCCTTCTCCACTATCAGAAAAGCTGCAT
 TGTTCCCTGATGGCCATAGAAGATTGGATAAGGTCAAGAGGAAGTAAACCTTCATGAAGATTTT
 GTATTCATAAAAAAGCTAAAGAGATGCAACAAAGGAGAAGGATCTTTATCCTTGCTGAACTGTGA
 GGAGATGAGAAGGCAATTTGAAGACCTTGTCAAGGATATAACGTTAAACAAAGAAGAGAAAAAAG
 AAAACAGCTTTGAAATGCAAAGAGGTGATGAGGATCCTCAAATTGCAGCACACGTTGTAAGCGAA
 GCCAACAGTAATGCAGCATCCGTTCTACAGTGGGCCAAGAAAGGATATTATACCATGAAAAGCAA****

CTTGGTAATGCTTGAAAATGGGAAACAGCTGACGGTTAAAAGAGAAGGACTCTATTATGTCTACA
 CTCAAGTCACCTTCTGCTCTAATCGGGAGCCTTCGAGTCAACGCCCATTCATCGTCGGCCTCTGG
 CTGAAGCCCAGCATTGGATCTGAGAGAATCTTACTCAAGGCGGCAAATACCCACAGTTCTCCCA
 GCTTTGCGAGCAGCAGTCTGTTCACTTGGCGGAGTGTGTTGAATTACAAGCTGGTGCTTCTGTGT
 TTGTCAACGTGACTGAAGCAAGCCAAGTGATCCACAGAGTTGGCTTCTCATCTTTTGGCTTACTC
 AAACCTCTGA

<210> SEQ ID NO 6
 <211> Longitud: 1042
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

5

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con gp100 humana y el dominio extracelular de CD40L murino

MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDGRDREGPRGEKGD
 GLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKEGNSAGEPGPKGERGLSGKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLY
 PEWTEAQRDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSQKVLDPGQVIWVNNIIINGSQ
 VWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAML
 GTHTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFVSVSQRLRALDGGNKHFRLNQPLTFALQL
 HDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGT
 TDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTTGPQAPTAEPSTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGM
 TPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGP
 DASSIMSTESITGSLGPLLDCTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFVTLDIVQIESAEILQAVPS
 GEGDAFELTVSCQGLPKEACMEISSPGCQPPAQRQCQVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNV
 SLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPPGLPGIPGPAGKEGPGSGKQGNIGPQKPGPKGEAGPK
 GEVGAQPMQGSTGAKGSTGPKGERGAPGVQAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKGDGRV
 PGDRGIKGESGLPDSAALRQMEALKGKLRLEVAF'SHYQKAALFPDGHRRLDKVEEVENLHEDF
 VFIKKLKRCKGEGSLSLLNCEEMRRQFEDLVKDI'LNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSE
 ANSNAASVLQWAKKGYTMTKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSQRPFIVGLW
 LKPSIGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFNVTASQVIHRVGFSSFGLL
 KL

5

tpa-hulqG1Fc-gp120-GCN4-huAPRIL

<210> SEQ ID NO 7

<211> Longitud: 3282

<212> TIPO: ADN

10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Secuencia señal tpa humana fusionada con la región Fc de IgG1 humana fusionada con gp120 de Env de VIH-1 fusionada con el motivo de trimerización de GCN4 fusionado con el dominio extracelular de

15 APRIL humana

Secuencia subrayada: Secuencia señal tpa humana

Secuencia en cursiva/en negrita: Dominio de Fc de IgG1 humana a región bisagra

Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de gp120 de Env de VIH-1

Secuencia en negrita: motivo de trimerización de GCN4

20 Secuencia en cursiva: Secuencia de APRIL murina (dominio extracelular)

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

5 <223> OTRA INFORMACIÓN: Secuencia señal tpa humana fusionada con la región Fc de IgG1 humana fusionada con gp120 de Env de VIH-1 fusionada con el motivo de trimerización de GCN4 fusionado con el dominio extracelular de APRIL humana

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSSCDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKWGNLVWTV
 YYGVPVWKEAKTTLFCASDAKSYEKEVHNWATHACVPTDPNPQEVIVLGNVTENFNMWKNMVDQ
 MHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTEVNVTNRVNNNSVNNNTTNVNNNSMNGDMKNCSEFNITT
 ELKDKKKNVYALFYKLDIVSLNETDDSETGNSSKYRRLINCNTSALTQACPKVSFDPIPIHYCAP
 AGYAILKCNKTFNGTGPCNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEGIIIRSENLTNNVKTII
 VHLNRSIEIVCVRPNNTROQSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISRTNWTTLREVRNKLRE
 HFPKNITFKPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSGLFSINYTENNTDGTPIITLPCRIRQIINM
 WQEVGRAMYAPPIEGNIACKSDITGLLLVDRGGSTNDSTNNNTEIFRPAGGDMRDNRSELYKYK
 VVEIKPLGIAPTEAKRRVVEREKRAVIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTAQARQVLSGIVQQQ
 SNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLKDDQLLMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIAR
 IKKLIGEVPASSPGHMGGSVREPALSVALWLSWGAVLGAVTCAVALLIQQTELOSLRREVSRLQ
 RSGGPSQKQGERPWQSLWEQSPDVLEAWKDGAKSRRRRRAVLTQKHKKKHSVLHLVPVNIITSKDSD
 VTEVMWQPVLRGRGLEAQGDIVRVWDTGIYLLYSQVLFHDVTFMTGQVVSREGQGRRETLFRCI
 RSMPSDPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDIITVKIPRANAKLSLSPHGTFGLGFVKL

10

huSP-D-NP-huSP-D-huCD40L-NST

<210> SEQ ID NO 9

<211> Longitud: 2769

<212> TIPO: ADN

15

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D humana fusionado con proteína NP de H. influenzae y el dominio extracelular de CD40L humano (menos la región tallo (No-Tallo (NST)))

20

Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de SP-D humana (dominio tipo colágeno)

Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de NP de H. influenzae

Secuencia en cursiva: Secuencia de CD40L humano (dominio extracelular, región tallo perdida)

MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTTPSACTLVMCSSVESGLPGRDGRDREGPRGEKGD
 PGLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSMASQGTKRSYEQMETDGERQNATEI
 RASVGMIGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLEEHP SAGKDPK
 KTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIWRQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALV
 RTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMVME LVRMIKRGINDRNFWRGENGRKTRIAYE
 RMCNILKGFQTAQAQKAMMDQVRESRNPNAEFEDLTF LARSALILRGSVAHKSCLPACVYGPVAV
 ASGYDFEREGYSLVGIDPFRLLONSQVYSLIRPNENPAHKSQ L VWMACHSAAFEDLRVLSFIKGT
 KVLPRGKLSTRGVQIASNENMETMESSTLELR SRYWAIRTRSGGNTNQQRASAGQISIQPTFSVQ
 RNLPFDRTTIMAAFNGNTEGRTSDMRTEIIRMESARPE DVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFD
 MSNEGSYFFGDNAEEYDNGPPGPPGVP GPAGREGPLGKQGNIGPQKPGPKGEAGPKGEV GAPGM
 QGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQGS PGARGPPGLKGDKGI PGDKGAKG
 ESGLPDVASLRQOVEALQGQVQHLQAAFSQYKKVELF PNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQGDQN
 PQIAAHVISEASSKTT SVLQWAEKGYTMSNNLVTL ENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREAS
 SQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSH
 GTGFTSFGLLKL

tpa-muACRP30-CSP1-muACRP30-muCD40L

- 5 <210> SEQ ID NO 11
- <211> Longitud: 1929
- <212> TIPO: ADN
- <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
- <220> CARACTERÍSTICA:
- 10 <223> OTRA INFORMACIÓN: Secuencia señal TPA humana fusionada con ACRP30 murina fusionada con CSP-1 de *P. yoelii* y el dominio extracelular de CD40L murino
- Secuencia subrayada: Secuencia TPA humana
- Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de ACRP30 murina
- Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de CSP-1 de *P. yoelii*
- Secuencia en cursiva: Secuencia de CD40L murino (dominio extracelular)
- 15

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCC
CAGC**GAAGATGACGTTACTACAAC**TGAAGAGCTAGCTCCTGCTTTGGTCCCTCCACCCAAGGGAA
CTTGTGCAGGTTGGATGGCAGGCATCCCAGGACATCCTGGCCACAATGGCACACCAGGCCGATGAT
GGCAAAATATACAATCGAAATATAGTCAACAGATTACTTGGCGATGCTCTCAACGGAAAACCAGA
 AGAAAAAAGATGATCCCCAAAAGATGGCAACAAAGATGATCTTCCAAAAGAAGAAAAAAG
 ATGATCTTCCAAAAGAAGAAAAAAGATGATCCCCAAAAGATCCTAAAAAAGATGATCCACCA
 AAAGAGGCTCAAAATAAATTGAATCAACCAGTAGTGGCAGATGAAAATGTAGATCAAGGGCCAGG

AGCACCACAAGGGCCAGGAGCACCACAAGGACCAGGAGCACCACAGGGTCCAGGAGCACCACAAG
 GACCAGGAGCACCACAAGGACCAGGAGCACCACAAGGTCCAGGAGCACCACAGGGTCCAGGAGCA
 CCACAGGGTCCAGGAGCACCACAAGGACCAGGAGCACCACAGGGGCCAGGAGCACCACAAGGACC
 AGGAGCACCACAAGGACCAGGAGCACCACAGGGGCCAGGAGCACCACAAGGGCCAGGAGCACCAC
 AAGAACCACCCCAACAACCACCCCAACAACCACCACAACAGCCACCACAACAGCCACCACAACAG
 CCACCACAACAGCCACCACAACAACCACGCCACAGCCAGATGGTAATAACAACAATAACAATAA
 TAATGGTAATAATAATGAAGATTCTTATGTCCCAAGCGCGGAACAAATACTAGAATTTGTTAAAC
 AGATAAGTAGTCAACTCACAGAGGAATGGTCTCAATGTAGTGTAACCTGTGGTCTGGTGTAAGA
 GTTAGAAAACGAAAAATGTAAACAAGCAACCAGAAAATTTGACCTTAGAGGATATTGATACTGA
 AATTTGTAATAATGGATAAATGTTCAAGTATATTTAATATTGTAAGCAATTCATTAGGATTTGTAA
 TATTATTAGTATTAGTATTCCTTTAAT**AGAGATGGCACTCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAAGGAGAT**
GCAGGTCTTCTTGGTCCTAAGGGTGAGACAGGAGATGTTGGAATGACAGGAGCTGAAGGGCCACG
GGGCTTCCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGGAGAGCCTGGAGAAGCCGCTCATAGAAGATTGGATA
 AGGTCAAGAGGAAGTAAACCTTCATGAAGATTTTGTATTTCATAAAAAAGCTAAAGAGATGCAAC
 AAAGGAGAAGGATCTTTATCCTTGCTGAACTGTGAGGAGATGAGAAGGCAATTTGAAGACCTTGT
 CAAGGATATAACGTTAAACAAAGAAGAGAAAAAAGAAAACAGCTTTGAAATGCAAAGAGGTGATG
 AGGATCCTCAAATTCGAGCACACGTTGTAAGCGAAGCCAACAGTAATGCAGCATCCGTTCTACAG
 TGGGCCAAGAAAGGATATTATACCATGAAAAGCAACTTGGTAATGCTTGAAAATGGGAAACAGCT
 GACGGTTAAAAGAGAAGGACTCTATTATGTCTACACTCAAGTCACCTTCTGCTCTAATCGGGAGC
 CTTGAGTCAACGCCCATTCATCGTCGGCCTCTGGCTGAAGCCCAGCATTGGATCTGAGAGAATC
 TTACTCAAGCGGCAAAATACCCACAGTTCCTCCCAGCTTTGCGAGCAGCAGTCTGTTCACTTGGG
 CGGAGTGTGTTGAATTACAAGCTGGTGCTTCTGTGTTTGTCAACGTGACTGAAGCAAGCCAAGTGA
 TCCACAGAGTTGGCTTCTCATCTTTTGGCTTACTCAAACCTCTGA

<210> SEQ ID NO 12

<211> Longitud: 642

5 <212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Secuencia de señal TPA humana fusionada con ACRP30 murina fusionada con CSP-1 de *P. yoelii* y el dominio extracelular de CD40L murino

10

MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSPSEDDVTTTEELAPALVPPPKGTCAGWMAGIPGHPGHNGTPGRD
 GKIYNRNIVNRLLDALNGKPEEKDDPPKDGKDDLPKEEKDDLPKEEKDDPPKDDPP
 KEAQNKL NQPVVADENV DQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQ
 PQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQPGAPQEPQPPQPPQPPQPPQPPQ
 PPQPPQPPRQPDGNNNNNNNGNNDSDSYVPSAEQILEFVKQISSQLTEEWSQCSVTCGSGVR
 VRKRKNV NKQPENLTLEDIDTEICKMDKCSSIFNIVSNSLGFVILLVLFVFN RDGTPGEKGEKGD
 AGLLGPKGETGDVGMTGAEGPRGFPGT PGRKGEPEGAAHRRLDKV EEEVNLHEDFVF IKKLR CN
 KEGSLSLLNCEEMRRQFEDLVKDITLNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQ
 WAKKGY YTMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSIGSERI
 LLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFNVT EASQVIHRVGFSSFGLLKL

muSP-D-Gag-muSP-D-muRANKL

<210> SEQ ID NO 13

<211> Longitud: 3006

15 <212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con Gag de VIH-1 y el dominio extracelular de RANKL murina

20 Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de SP-D murina (dominio tipo colágeno)

Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de Gag de VIH-1 (10 aa desplazados a lo largo de SP-D)

Secuencia en cursiva: Secuencia de RANKL murina (dominio extracelular)

**ATGCTGCCCTTTCTCTCCATGCTTGTCTTGCTTGTACAGCCCCTGGGAAATCTGGGAGCAGAAAT
 GAAGAGCCTCTCGCAGAGATCAGTACCCAACACCTGCACCCTAGTCATGTGTAGCCCAACAGAGA
 ATGGCCTGCCTGGTTCGTGATGGACGGGATGGGAGAGAAGGTCCACGGGGTGAGAAGGGTGATCCA
 GGTGTTGCCAGGACCTATGGGGCTCTCAGGGTTCAGGGCCCTACAGGTCCAGTTGGACCCAAAGG
 AGAGAAATGGCTCTGCTGGCGAACCTGGACCAAAGGGAGAACGTGGACTAAGTGGACCTCCAGGAC
 TTCCAGGTATTCTGGTCCAATGGGAGCCAGGGCCAGCGTGTCTGCTGGGGGCGAGCTGGACAGG
 TGGGAGAAGATTAGGCTGAGGCCCGGAGGAAAAGAAGTACAAACTGAAACACATCGTGTGGGC
 CTCCCGGGAGCTGGAACGGTTCGCCGTGAATCCTGGGCTGCTGGAGACCTCTGAGGGCTGCAGAC
 AGATCCTGGGACAGCTGCAGCCTAGCCTGCAGACCGGAAGCGAGGAGCTGAGGTCTCTGTACAAC
 ACCGTGGCCACACTGTAAGTGCCTGACCCAGCGGATTGAGGTGAAGGATACCAAGGAAGCCCTGGA
 GAAGATTGAGGAAGAGCAGAATAAGTCCAAGAAGAAAGCCCAGCAGGCCCGCCGCCGACACAGGAA
 ATAGCTCCAGGTGTCTCAGAACTACCCCATCGTGCAGAACCTGCAGGGACAGATGGTGCACCAG
 GCCATCAGCCCCCGGACCCTGAACGCCTGGGTGAAGGTGGTGGAAAGAGAAAGCCTTCAGCCCAGA
 AGTGATCCCCATGTTTCAGCGCCCTGAGCGAAGGGGCCACCCACAGGACCTGAATACAATGCTGA
 ATACAGTGGGCGGCCACCAGGCCGCCATGCAGATGCTGAAGGAGACCATTAACGAGGAGGCCGCC
 GAGTGGGATAGGCTGCACCCAGTGCACGCCGGGCCCATCGCCCCAGGGCAGATGAGGGAGCCACG
 GGGCTCTGACATCGCCGGCACCACCTCTACCTGCAGGAGCAGATCGGCTGGATGACCAATAACC
 CACCTATTCCCCTGGGAGAAATCTACAAAAGTGGATTATCCTGGGGCTGAACAAGATCGTGAGA
 ATGTACTCCCAACATCCATTCTGGACATCCGGCAGGGCCCAAAGGAACCCCTTAGAGACTACGT
 GGATAGTTCTACAAAACCTGCGCGCCGAGCAGGCCCTCCAGGAGGTGAAGAAGTGGATGACCG
 AGACACTGCTGGTGCAGAATGCCAACCAGACTGTAAGACCATTCTGAAGGCCCTGGGACCAGCC
 GCCACCTGGAGGAAATGATGACAGCCTGCCAGGGGGTGGGCGGACCCGGCCACAAGGCCCGCGT
 GCTGGCCGAGGCCATGTCCAGGTGACAAATTCGCCACCATCATGATGCAGCGCGAAATTTTC
 GGAATCAGCGCAAAACAGTGAATGCTTCAATTGCGGGAAGGAGGGCCACATCGCCAAGAATTGC
 AGAGCCCCAAGGAAGAAGGGCTGCTGGAAGTGCAGGAAAGGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCAC
 AGAGCGCCAGGCCAATTTCTGGGCAAGATCTGGCCATCCCAAGGGGCGGCTGGAAACTTCC
 TGCAGAGCCGGCCCGAACCCACAGCCCCCTGAAGAATCCTTCCGGTTCGGAGAGGAAACAACC
 ACACCAGCCAGAAGCAGGAGCCTATCGACAAGGAAGTGTACCCACTGGCCAGCCTGAGAAGCCT
 GTTCGGCAACGATCCAAGCAGCCAG**GCTGGGAAAGAAGGTCCCTCTGGGAAGCAGGGGAACATAG
 GACCTCAAGGCAAACCAGGTCTTAAAGGAGAGGCTGGGCCCAAAGGAGAAGTAGGTGCTCCTGGC
 ATGCAAGGATCTACAGGGGCAAAGGCTCCACAGGCCCAAAGGAGAAAGAGGTGCCCTGGTGT
 GCAAGGAGCCCCAGGGAATGCTGGAGCAGCAGGACCTGCCGGACCTGCCGGTCCACAGGGAGCTC
 CAGGTTCCAGGGGGCCCCCAGGACTCAAGGGGGACAGAGGTGTTCTGGAGACAGAGGAATCAA****

**GGTGAAAGCGGGCTTCCAGACAGTGTCTGCTCTGAGGCAGCAGATGGAGGCCTTAAAAGGAAAACCT
 ACAGCGTCTAGAGGTTGCCCTTCTCCACTATCAGAAAGCTGCATTGTTCCCTGATGGCCGAGCGC
 AGATGGATCCTAACAGAATATCAGAAGACAGCACTCACTGCTTTTATAGAATCTGAGACTCCAT
 GAAAACGCAGATTTGCAGGACTCGACTCTGGAGAGTGAAGACACACTACCTGACTCCTGCAGGAG
 GATGAAACAAGCCTTTTCAGGGGGCCGTGCAGAAGGAACTGCAACACATTGTGGGGCCACAGCGCT
 TCTCAGGAGCTCCAGCTATGATGGAAGGCTCATGGTTGGATGTGGCCCAGCGAGGCAAGCCTGAG
 GCCAGCCATTTGCACACCTCACCATCAATGCTGCCAGCATCCCATCGGGTTCCCATAAAGTCAC
 TCTGTCTCTTGGTACCACGATCGAGGCTGGGCCAAGATCTCTAACATGACGTTAAGCAACGGAA
 AACTAAGGGTTAACCAAGATGGCTTCTATTACCTGTACGCCAACATTTGCTTTTCGGCATCATGAA
 ACATCGGGAAGCGTACCTACAGACTATCTTCAGCTGATGGTGTATGTGCTTAAAACCAGCATCAA
 AATCCCAAGTTCTCATAACCTGATGAAAAGGAGGGAGCACGAAAAACTGGTTCGGGCAATTTCTGAAT
 TCCACTTTTATTCCATAAATGTTGGGGGATTTTTCAAGCTCCGAGCTGGTGAAGAAATTAGCATT
 CAGGTGTCCAACCCTTCCCTGCTGGATCCGGATCAAGATGCGACGTACTTTGGGGCTTTCAAAGT
 TCAGGACATAGACTGA**

<210> SEQ ID NO 14

<211> Longitud: 1001

5 <212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con Gag de VIH-1 y el dominio extracelular de RANKL murina

10

MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLMCSPTENGLPGRDGRDREGPRGEKGGP
 GLPGPMGLSGLQGPPTGPVGPKEGNSAGEPGPKGERGLSGPPGLPGIPGPMGARASVLSGGELDR
 WEKIRLRPGGKKKYKCLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYN
 TVATLYCVHQRIEVKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQAAAADTGNSSQVSNYPYIVQNLOGQMVHQ
 AISPRTLNAWVKVVEEKAFSPVEIPMFSALESEGATPQDLNNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAA
 EWDRLEHPVHAGPIAPGQMPREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVR
 MYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPA
 ATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIMMQRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHIKNC
 RAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPPEESFRFGEEET
 TPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQAGKEGPGSKQGNIGPQKPGPKGEAGPKGEVGPAG
 MQGSTGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKGDGRVPGDRGIK
 GESGLPDSAALRQOMEALKGKLRLEVAFAFHYQKAALFPDGRAQMDPNRISEDSSTHCFYRILRLH
 ENADLQDSTLESEDTLPDSCRRMKQAFQGAVQKELQHIVGPQRFSGAPAMMEGSWLDVAQRGKPE
 AQPFAHLTINAASIPSGSHKVTLSWYHDRGWAKISNMTLNGLKLRVNQDGFYLYLANICFRHHE
 TSGSVPTDYLQLMVYVVKTSIKIPSSHNLKGGSTKNWSGNSEFHFYSINVGGFFKLAGEEISI
 QVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVQDID

huSP-D-WT1-huSP-D-huCD40L

- <210> SEQ ID NO 15
- 5 <211> Longitud: 1986
- <212> TIPO: ADN
- <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
- <220> CARACTERÍSTICA:
- 10 <223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D humana fusionado con WT1 humana y el dominio extracelular de CD40L humano
- Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de SP-D humana (dominio tipo colágeno)
- Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de WT1 humana
- Secuencia en cursiva: Secuencia de CD40L humano (dominio extracelular)

**ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTACTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGAAGCAGA
AATGAAGACCTACTCCCACAGAACAACGCCAGTGCCTTGACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTGG
AGAGTGGCCTGCCTGGTTCGCGATGGACGGGATGGGAGAGAGGGCCCTCGGGGCGAGAAGGGGGAC
CCAGGTTTGGCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAAGCTGGCCAGTTGGGCCAA
AGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCTGGACCAAAGGGAGACACTGGGCCAAGTATGGGCCATC
ATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTATATGCGACGTGTG
CCTGGAGTAGCCCCGACTCTTGTACGGTCGGCATCTGAGACCAGTGAGAAACGCCCTTCATGTG
TGCTTACCCAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCTGTCCCCTTACAGATGCACAGCAGGAAGC
ACACTGGTGAGAAACCATAACCAGTGTGACTTCAAGGACTGTGAACGAAGGTTTTTTTCGTTTCAGAC
CAGCTCAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGTGTGAAACCATTCCAGTGTAAAACCTGTTCAGCG
AAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCTGAAGACCCACACCAGGACTCATACAGGTGAAAAGCCCTTCA
GCTGTCCGTGGCCAAGTTGTTCAGAAAAAGTTTGGCCGGTCAGATGAATTAGTCCGCCATCACAAC
ATGCATCAGAGAAACATGACCAAACCTCCAGCTGGCGCTTGGACCTCCAGGACCTCCCGGTGTGCC
TGGTCCAGCTGGAAGAGAAGGTCCCCTGGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCAAGCCAG
GCCAAAAGGAGAAGCTGGGCCAAAGGAGAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCTCGGCAGGG
GCAAGAGGCCCTCGCAGGCCCTAAGGGAGAGCGAGGTGTCCCTGGTGAGCGTGGAGTCCCTGGAAA
CACAGGGGCAGCAGGGTCTGCTGGAGCCATGGGTCCCAGGGAAGTCCAGGTGCCAGGGGACCCC
CGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAAAGTGGGCTTCCA
GATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACCTCCAGGCTGC
TTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTCCCAAATGGCCAAAGTGTCTGGGGAGAAGATTTTCA
AGACAGCAGGCTTTGTAAAACCATTTACGGAGGCACAGCATAGAAGGTTGGACAAGATAGAAGAT
GAAAGGAATCTTCATGAAGATTTTGTATTTCATGAAAACGATACAGAGATGCAACACAGGAGAAAG
ATCCTTATCCTTACTGAAGTGTGAGGAGATTTAAAAGCCAGTTTGAAGGCTTTGTGAAGGATATAA
TGTTAAACAAAGAGGAGACGAAGAAAGAAAACAGCTTTGAAATGCAAAAAGGTGATCAGAATCCT
CAAATTGCGGCACATGTCATAAGTGAGGCCAGCAGTAAAACAACATCTGTGTTACAGTGGGCTGA
AAAAGGATACTACCCATGAGCAACAACCTGGTAACCCTGGAAAATGGGAAACAGCTGACCGTTA
AAAGACAAGGACTCTATTATATCTATGCCCAAGTCACCTTCTGTTCCAATCGGGAAGCTTCGAGT
CAAGCTCCATTTATAGCCAGCCTCTGCCTAAAGTCCCCCGGTAGATTCGAGAGAATCTTACTCAG
AGCTGCAAAATACCCACAGTTCCGCCAAACCTTGGCGGCAACAATCCATTCACCTGGGAGGAGTAT
TTGAATTGCAACCAGGTGCTTCGGTGTGTTGTCAATGTGACTGATCCAAGCCAAGTGAGCCATGGC
ACTGGCTTCACGTCCTTTGGCTTACTCAAACCTCTGA**

<210> SEQ ID NO 16

<211> Longitud: 661

5 <212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D humana fusionado con WT1 humana y el dominio extracelular de CD40L humano

10

MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTTPSACTLVMCSSLVESGLPGRDGRDREGPRGEKGD
PGLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGSPMGHHHHHHHHSSGHI EGRHMRRV
PGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHRSRKHTEKPYQCDFKDCERRFFRSD
QLKRHQRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRHTGEKPFSCRWPSCQKKFARSDLVRRHN
MHQRNMTKLQLALGPPGPPGVPGPAGREGPLGKQGNIGPQKPGPKGEAGPKGEVGPMPGMSAG
ARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQSPGARGPPGLKGDKGI PGDKGAKGESGLP
DVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQHRRLDKIED
ERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNP
QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVLTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASS
QAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSSQVSHG
TGFTSFGLLKL

muSP-D-MAGE-A3-muSP-D-muBAFF

<210> SEQ ID NO 17

<211> Longitud: 2394

15 <212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con MAGE-A3 murina y el dominio extracelular de BAFF murina. 20 aa delecionados de la secuencia de SP-D. Secuencia en cursiva/en negrita: Secuencia de SP-D murina (dominio tipo colágeno) (20 aa delecionados) Secuencia no en cursiva/en negrita: Secuencia de MAGE-A3 murina
 5 Secuencia en cursiva: Secuencia de BAFF murina (dominio extracelular)

**ATGCTGCCCTTTCTCTCCATGCTTGTCTTGTGTTGTACAGCCCCCTGGGAAATCTGGGAGCAGAAAT
 GAAGAGCCTCTCGCAGAGATCAGTACCCAACACCTGCACCCTAGTCATGTGTAGCCCAACAGAGA
 ATGGCCTGCCTGGTCTGATGGACGGGATGGGAGAGAAGGTCACGGGGTGAGAAGGGTGATCCA
 GGTTCGCAGGACCTATGGGGCTCTCAGGGTTGCAGGGCCCTACAGGTCCAGTTGGACCCAAAGG
 AGAGAATGGCTCTGCTGGCGAACCTGGACCAAAGGGAGAACGTGGACTAAGTGGAAATGGCTGATT
 CCCATAACACCCAATACTGCAACCTCGAAGAGAGTGTCTCAGGCCCAACAGGAATTAGACAATGAC
 CAGGAGACCATGGAGACATCAGAGGAGGAGGAAGATAACCACCACCTCAAATAAAGTGTATGGCAG
 TGCAATACCAAGTCCCTCCCAGAGTCCCTCAGAGAGCCTACTCTCCCTGTGTGGCACTGGCCTCCA
 TCCCTGATAGCCCATCTGAGGAAGCTTCCATCAAAGGATCAGAGGGCCTGGAAGACCCACTTCAT
 TTGTTGCACAATGCACAGAACACAAAGGTGTATGACTTGGTGGACTTTCTGGTTTTAACTATCA
 AATGAAGGCATTTACTACCAAAGCAGAAATGTTGGAAAATATTGGTAGAGAGTATGAGGAGTACT
 ACCCTCTGATCTTTAGTGAGGCCTCTGAGTGTCTGAAGATGGTCTTTGGCCTTGACATGGTAGAA
 GTGGACTCCTCTGTCCACACCTATATGCTTGTCACTGCCCTGGGGATCACCTATGATGGCATGAT
 GACTGATGTCCAGGGTATGCCCAAGACAGGTATCCTCATAGCTGTACTGAGTGTCATTTTTCATGA
 AGGGAACTATGTCAGTGAGGAGATTATCTGGGAAATGCTGAATAACATAGGGTTGTGTGGTGGG
 AGGGATCCTTACATACATAAAGACCCAGGAAGCTCATCTCTGAGGAGTTTGTGCAGGAAGGGTA
 CCTGGAATACAGGCAGGTGCCCAATAGTGATCCCCCTAGCTATGGGTTCCCTGTGGGGCCCAAGGG
 CTTTTGCAGAAACCAGCAAATGAAAGTCTTACAGTTCTTTGCCAGCATTAATAAGACTCATCCC**

AGAGCCTACCCTGAAAAGTATGCAGAGGCTTTACAAGATGAGATAGACAGGACCAAGACCTGGAT
 CTTGAACAGATGCTCCAACCTCTGACCTACACACATTC **GGGAACATAGGACCTCAAGGCAAAC
 CAGGTCCTAAAGGAGAGGCTGGGCCCAAAGGAGAAGTAGGTGCTCCTGGCATGCAAGGATCTACA
 GGGGCAAAGGCTCCACAGGCCCAAAGGGAGAAAGAGGTGCCCTGGTGTGCAAGGAGCCCCAGG
 GAATGCTGGAGCAGCAGGACCTGCCGGACCTGCCGGTCCACAGGGAGCTCCAGGTTCCAGGGGGC
 CCCAGGACTCAAGGGGGACAGAGGTGTTCTGGAGACAGAGGAATCAAAGGTGAAAGCGGGCTT
 CCAGACAGTGCTGCTCTGAGGCAGCAGATGGAGGCCTTAAAAGGAAAACCTACAGCGTCTAGAGGT
 TGCCTTCTCCACTATCAGAAAGCTGCATTGTTCCCTGATGGCCAGTTGGCTGCCTTGCAAGCAG
 ACCTGATGAACCTGCGCATGGAGCTGCAGAGCTACCGAGGTTGAGCAACACCAGCCGCCGCGGGT
 GCTCCAGAGTTGACCGCTGGAGTCAAACCTCTGACACCGGCAGCTCCTCGACCCACAACCTCCAG
 CCGCGGCCACAGGAACAGACGCGCTTTCCAGGGACCAGAGGAAACAGAACAAGATGTAGACCTCT
 CAGCTCCTCCTGCACCATGCCTGCCTGGATGCCGCCATTCTCAACATGATGATAATGGAATGAAC
 CTCAGAAACATCATTCAAGACTGTCTGCAGCTGATTGCAGACAGCGACACGCCGACTATACGAAA
 AGGAACCTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCTTTAAAAGAGGAAATGCCTTGGAGGAGAAAAG
 AGAACAAAATAGTGGTGGAGGCAAACAGGCTATTTCTTCATCTACAGCCAGGTTCTATACACGGAC
 CCCATCTTTGCTATGGGTCATGTTCATCCAGAGGAAGAAAAGTACACGTCTTTGGGGACGAGCTGAG
 CCTGGTGACCCTGTTCCGATGTATTGAGAAATATGCCCAAAACACTGCCCAACAATTCTGCTACT
 CGGCTGGCATCGCGAGGCTGGAAGAAGGAGATGAGATTGAGCTTGAATTCTCGGGAGAATGCA
 CAGATTTACGCAACGGAGACGACACCTTCTTTGGTGCCCTAAAACCTGCTGTAA**

<210> SEQ ID NO 18

<211> Longitud: 797

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Dominio tipo colágeno de Proteína Surfactante D murina fusionado con MAGE-A3 murina y el dominio extracelular de BAFF murina. 20 aa delecionados de la secuencia de SP-D.

ES 2 775 278 T3

MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDGRDREGPRGEKGD
GLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKEGNSAGEPGPKGERGLSGMADSHNTQYCNLEESAQAQQEELDND
QETMETSEEEEDTTTTSNKVYGS AIPSPQSPQRAYSPCVALASIPDSPSEEASIKGSEGLEDPLH
LLHNAQNTKVYDLVDFLVLNYQKAF TTKAEMLENIGREYEEYYPLIFSEASECLKMVFGLDMVE
VDSSVHTYMLVTALGITYDGMMDVQGM PKTGILIAVLSVIFMKGNYVSEEIWEMLN NIGLCGG
RDPYIHKDPRKLISEEFVQEGYLEYRQVPNSDPPSYGFLWGPRAFAETSKMKVLQFFASINKTHP
RAYPEKYAEALQDEIDRTKTWILNRC SNSSDLHTFGNIGPQKPGPKGEAGPKGEV GAPGMQGST
GAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKGDRGVPGDRGIKGESGL
PDSAALRQQMEALKGKLRLEVAFSHYQKAALFPDGQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAG
APELTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGHRNRRAFQGPETE QDVDLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMN
LRNIIQDCLQLIADSDTPTIRKGT YTFVPWLLSFKRGNALEEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTD
PIFAMGHVIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENA
QISRNGDDTFFGALKLL

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende los siguientes dominios codificantes de proteína ligados operativamente por enlaces peptídicos en el siguiente orden:

5 un armazón de multimerización formado por una parte de una proteína colectina, en el que la parte de la colectina se autoensambla dentro de dos o más brazos tipo colágeno triméricos de la colectina unidos en su extremo N-terminal por una región nodo ligada a disulfuro de la colectina,
 10 un antígeno, en donde el antígeno está contenido dentro del armazón de multimerización, estando el antígeno situado dentro de la parte del armazón de multimerización que forma el brazo de la colectina, y
 un dominio extracelular de un ligando de la superfamilia de TNF, en donde el ligando de la superfamilia TNF se selecciona del grupo que consiste en CD40L (TNFSF5), CD27L (TNFSF7), CD137L (TNFSF9), OX40L (TNFSF4), GITRL, 4-1BBL, RANKL, LIGHT, CD70 y BAFF o un anticuerpo de cadena sencilla que se une a un receptor de TNFSF.

15 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 16 o 18.

20 3. La proteína de fusión de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el armazón de multimerización se selecciona del grupo que consiste en SPD, SPA, conglutinina, colectina-43, MBL1 y MBL2.

4. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el armazón es SPD y en la que el antígeno proteico está situado desde 10 a 140 aminoácidos del extremo C-terminal a la región nodo (*hub*) y de 0 a 167 aminoácidos del extremo N-terminal al dominio extracelular del ligando de la superfamilia de TNF.

25 5. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; comprendiendo preferentemente la secuencia de SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 15 o 17.

30 6. Un vector viral que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5, preferentemente en donde el vector se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, poxvirus, alfavirus, arenavirus, flavivirus, rabdovirus, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, paramixovirus y picornavirus.

35 7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el armazón de multimerización está formado por una proteína seleccionada de la superfamilia de la colectina a partir de la cual se ha retirado el dominio del extremo C-terminal natural y se ha reemplazado por el dominio extracelular ligado operativamente de un ligando de la superfamilia de TNF o el anticuerpo de cadena sencilla que se une a un receptor de TNFSF.

40 8. Un método *ex vivo* de activación de una célula presentadora de antígeno (APC) tratando la APC con la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7 para inducir la maduración de la APC, de modo que la APC tratada se puede administrar a un sujeto como una vacuna o en inmunoterapia, y en donde la APC se selecciona del grupo de células dendríticas, monocitos, macrófagos o linfocitos B.

45 9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7 para su uso como una vacuna o para su uso en la inmunoterapia para inducir una respuesta inmune frente al antígeno en un sujeto que necesita esta respuesta inmune, en la que la proteína de fusión es para ser administrada a dicho sujeto.

50 10. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7 para su uso como una vacuna o para su uso en la inmunoterapia según la reivindicación 9, en donde el antígeno es de un agente de enfermedad infeccioso seleccionado del grupo de virus, bacterias, hongos, protozoos o parásitos; o en la que el antígeno es de una célula maligna o virus causante de cáncer.

55 11. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7 para su uso como una vacuna o para su uso en la inmunoterapia para inducir una respuesta inmune frente al antígeno en un sujeto que necesita esta respuesta inmune, en donde la secuencia de ácidos nucleicos se administra al sujeto como ADN o ARN o bien sola o mezclada con polímeros para aumentar la expresión de la proteína a partir de la secuencia de ácidos nucleicos *in vivo*.

60 12. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7 para su uso como una vacuna o para su uso en la inmunoterapia para inducir una respuesta inmune frente al antígeno en un sujeto que necesita esta respuesta inmune, en donde la secuencia de ácidos nucleicos se administra al sujeto usando un vector viral seleccionado de, pero sin limitación, adenovirus, poxvirus, alfavirus, arenavirus, flavivirus, rabdovirus, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, paramixovirus y picornavirus.

65 13. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7 para su uso como una vacuna o para su uso en la inmunoterapia según la reivindicación 9, en donde el sujeto requiere protección de un agente infeccioso o tumor y en la que el sujeto es un ser humano.

Actividad de TNFSF con frecuencia requiere \geq 2 trímeros

La agrupación del receptor es necesaria para la activación

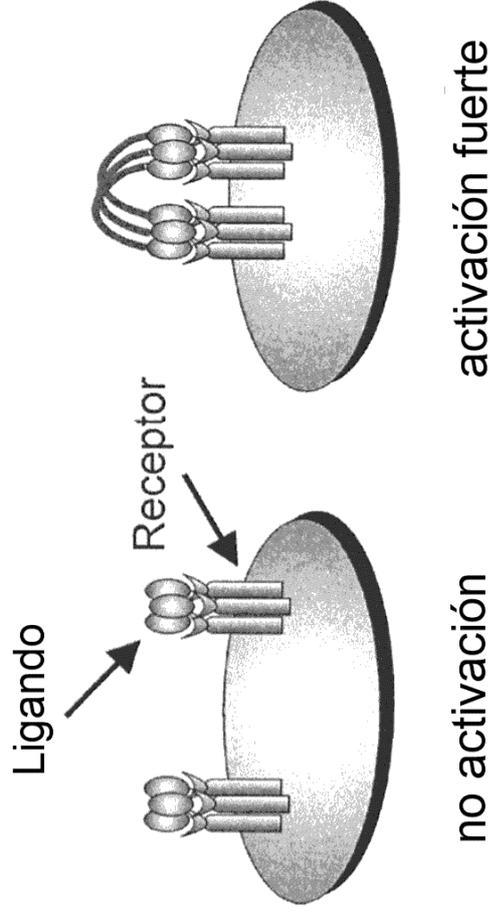
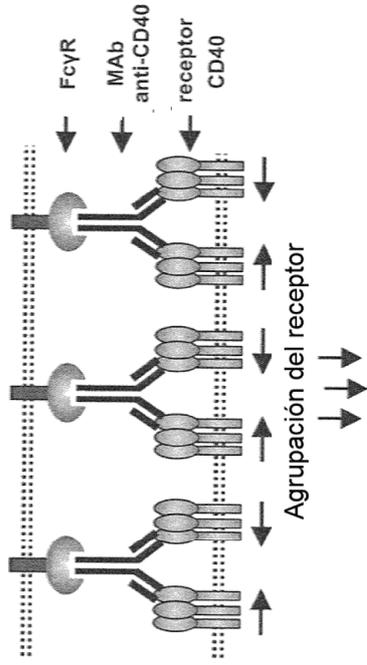


FIG. 1

Agrupación de receptores de TNFSF por anticuerpos anti-receptor de TNFSF "agonísticos"

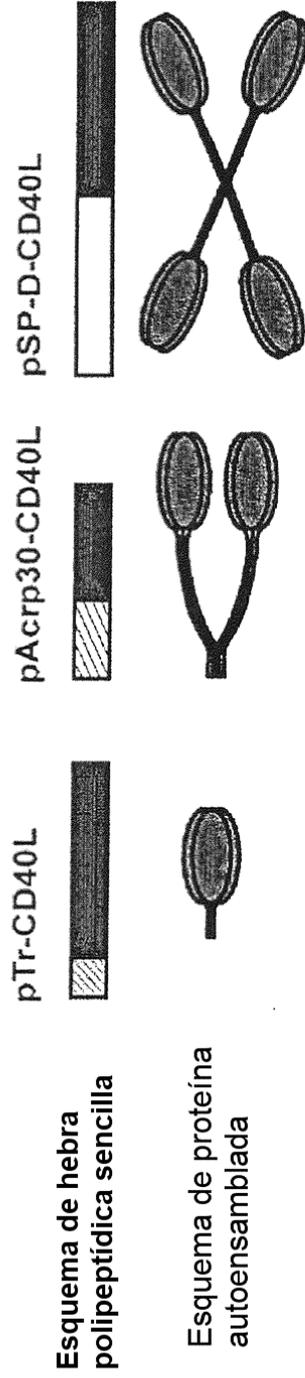
Los anticuerpos anti-CD40 agonísticos deben unirse a receptores de Fc sobre células adyacentes para estimular células portadoras de CD40



Wilson et al., "An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells." *Cancer Cell* 19:101-113, 2011.
White et al., "Interaction with FcγRIIb is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody." *J Immunol* 187:1754-1763, 2011

FIG. 2

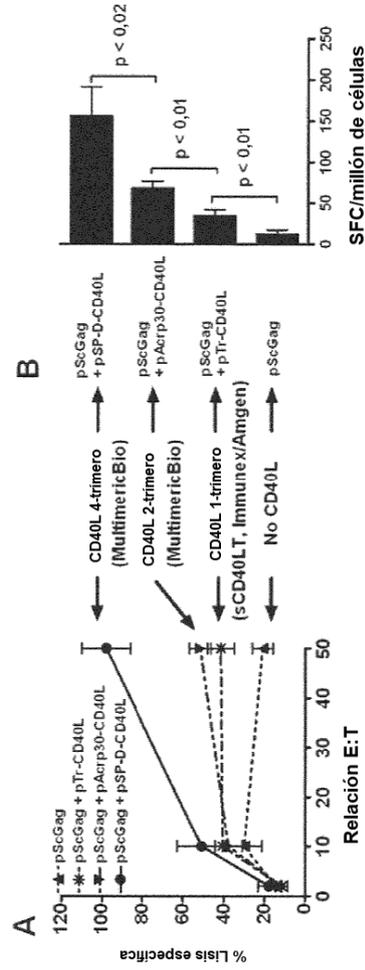
CD40L como adyuvante de vacuna



Para examinar el efecto de la valencia sobre la actividad adyuvante, se ensayaron las construcciones de ADN de 1-trímero, 2-trímero y 4-trímero en una vacuna de ADN

FIG. 3

Se aumenta la respuesta del linfocito T CD8+ a la vacunación con ADN mediante un plásmido adyuvante con 2 o más trímeros CD40L ligados



- Un plásmido para el antígeno Gag de VIH (pScGag) se mezcló con plásmidos de CD40L de 1, 2, y 4 trímeros
- UltraCD40L (pSP-D-CD40L) era el adyuvante superior para respuestas de linfocito T CD8+ medidas por (a) citotoxicidad y (b) ensayos ELISPOT de IFN-γ

Stone, G.W. et al (Kornbluth group). "Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines". J Virol 80:1762-1772, 2006.

FIG. 4

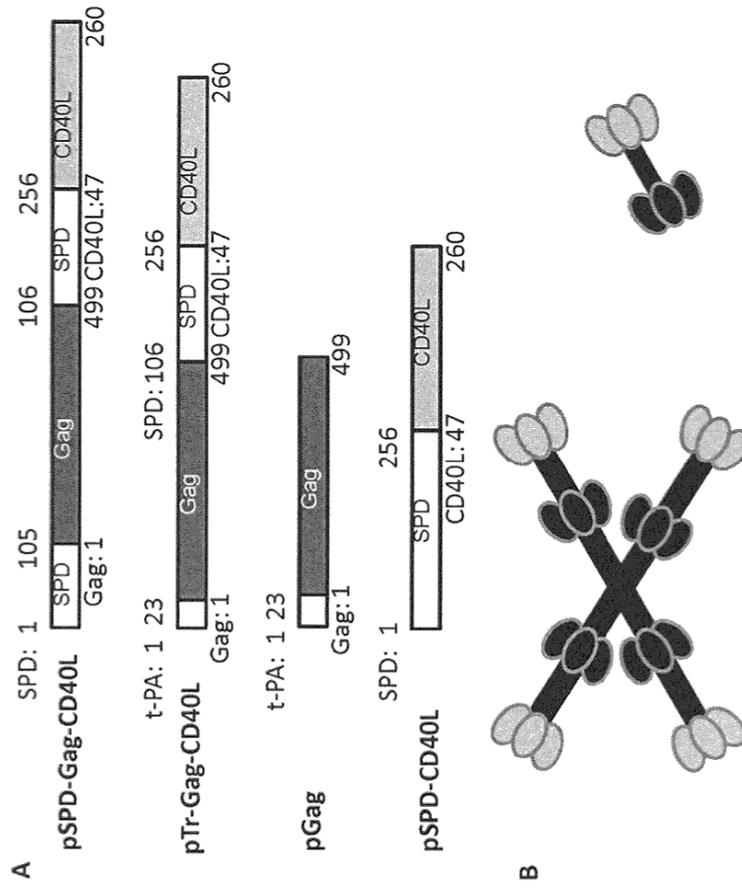


FIG. 5

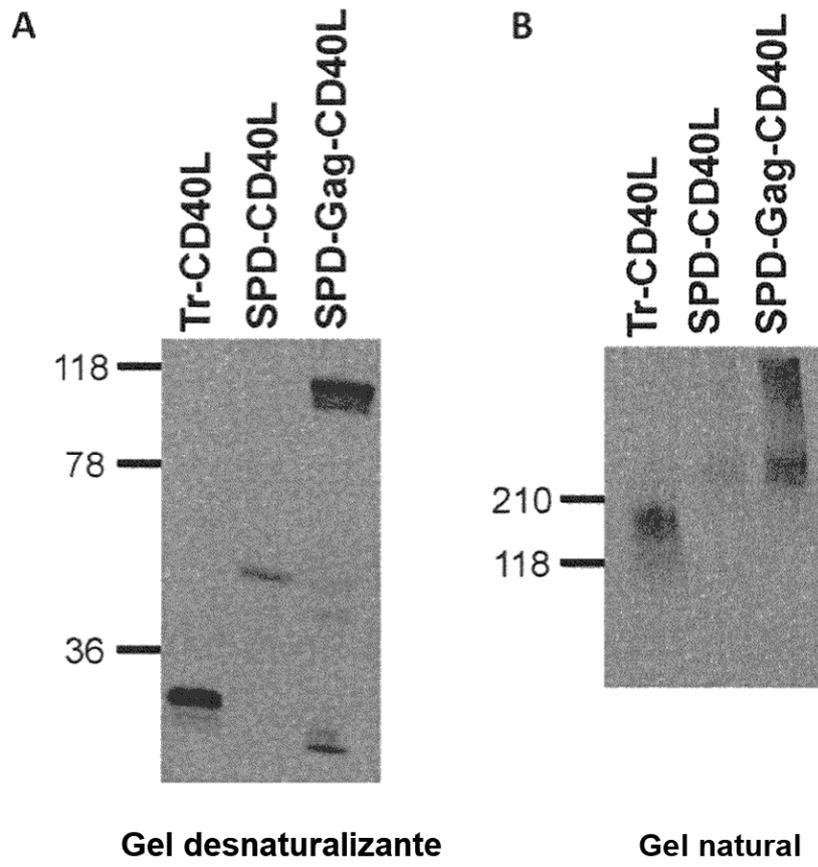


FIG. 6

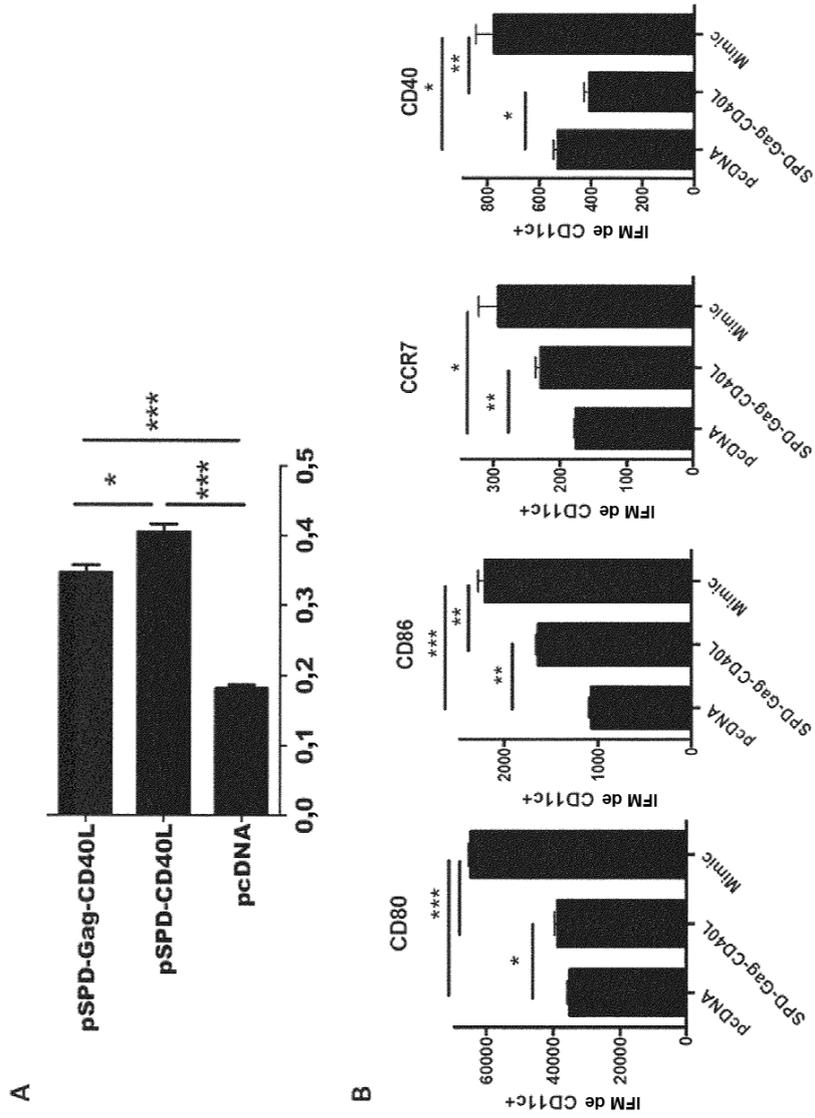


FIG. 7

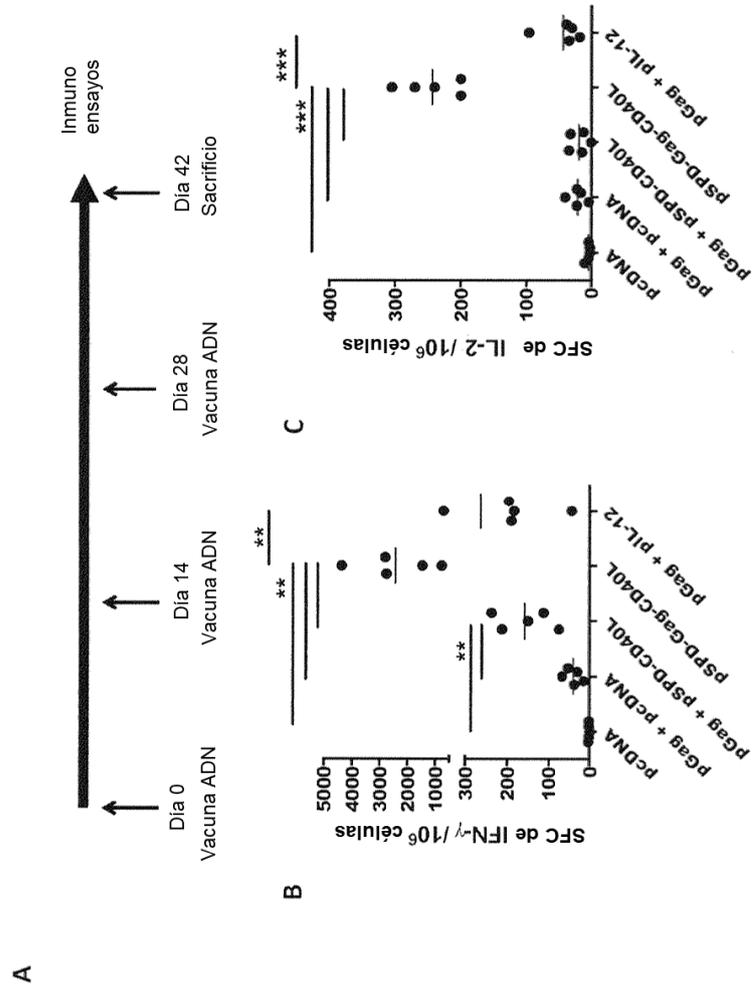


FIG. 8

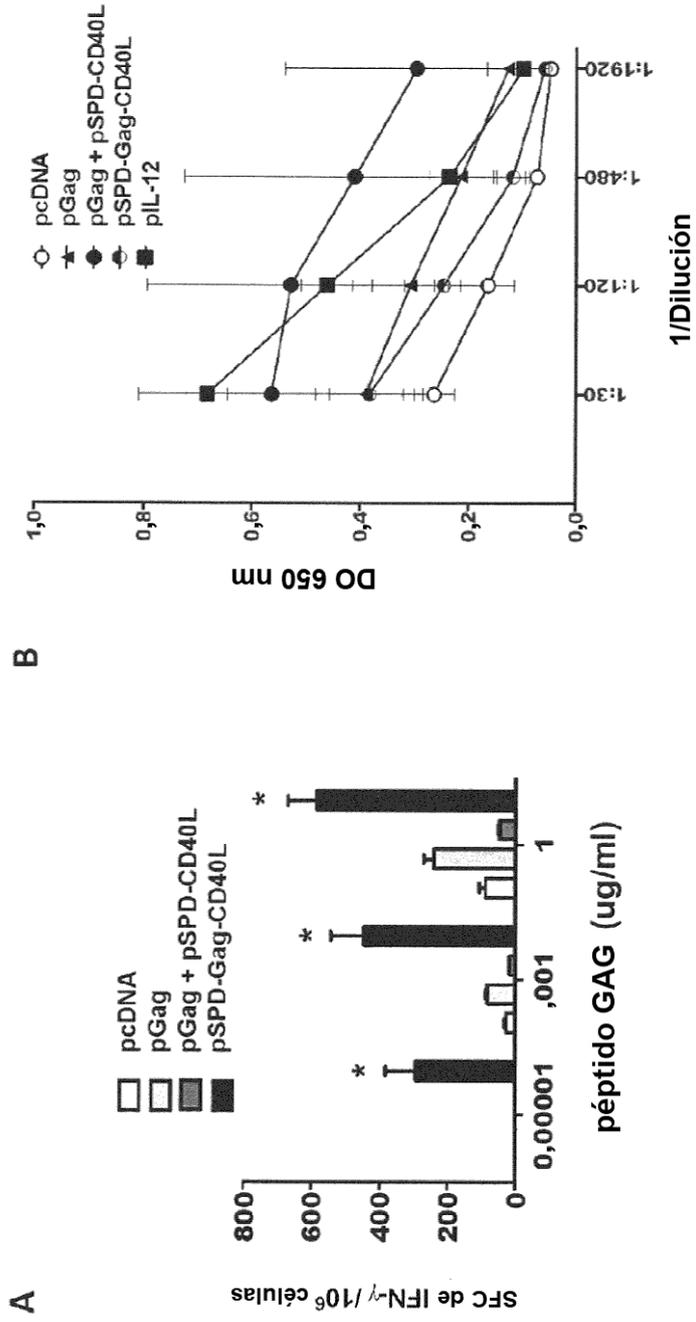


FIG. 9

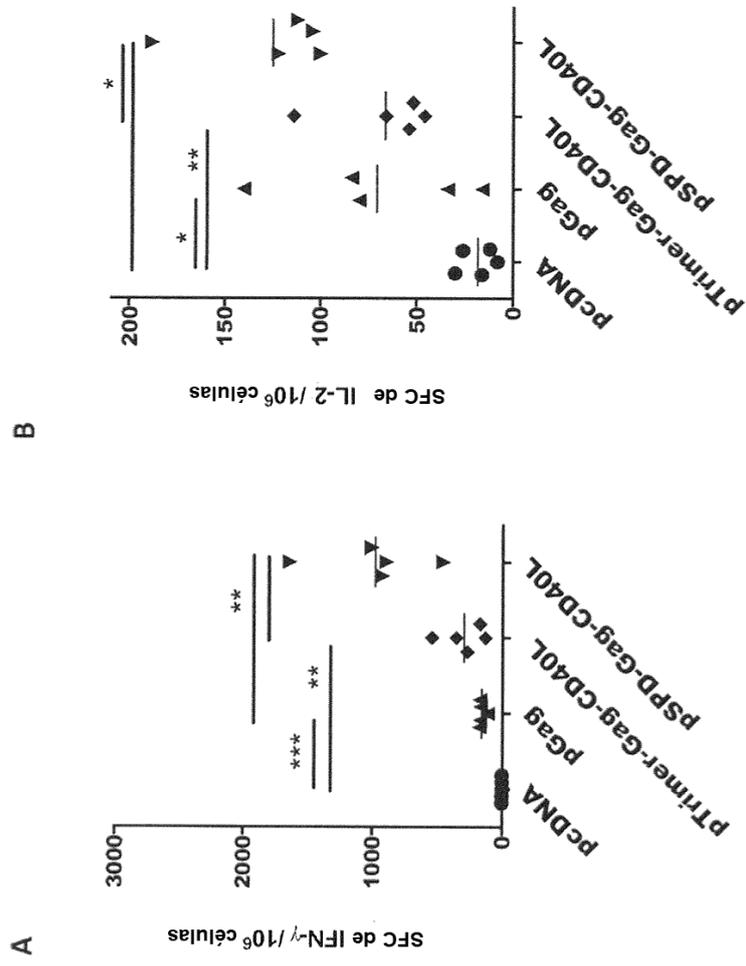


FIG. 10

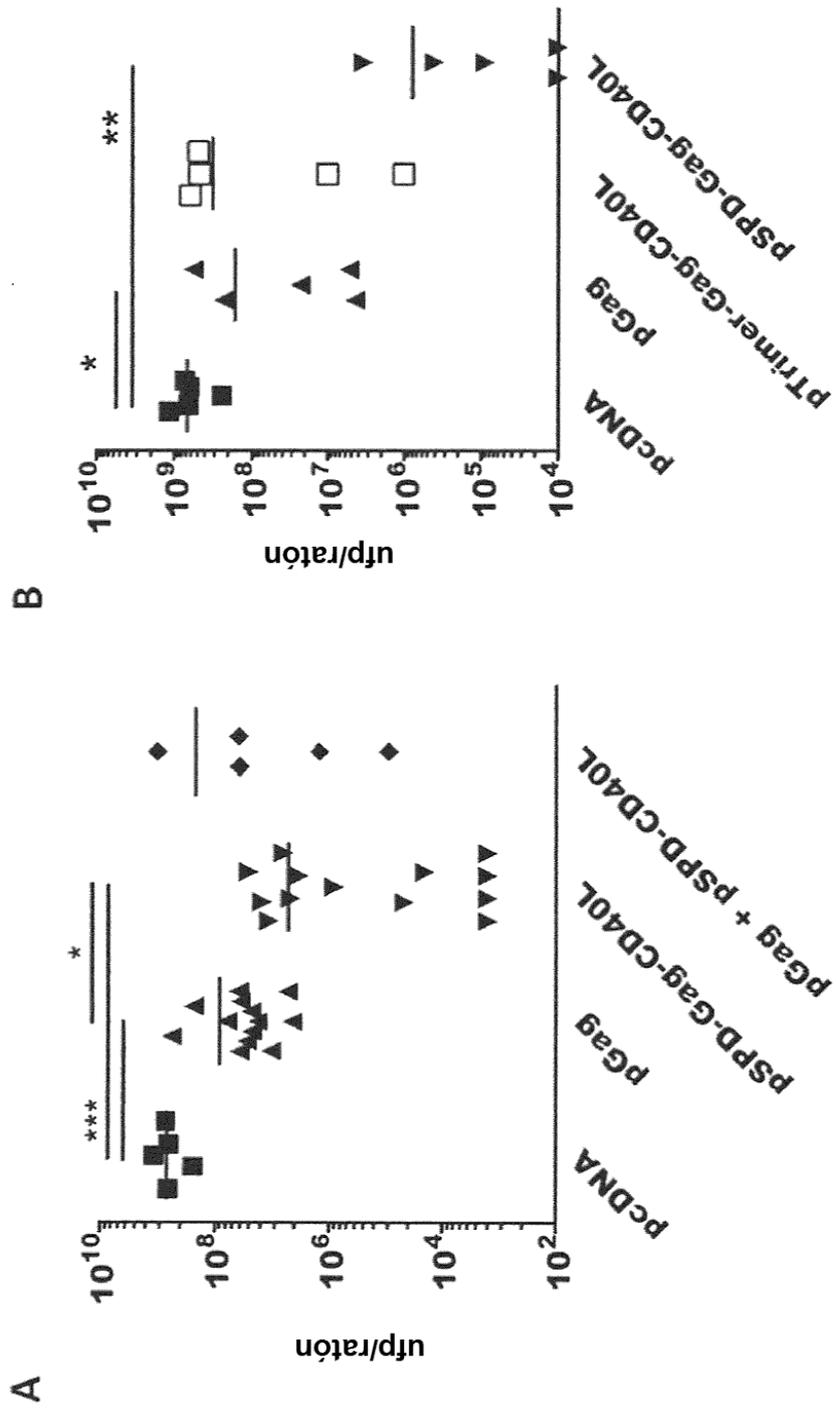


FIG. 11

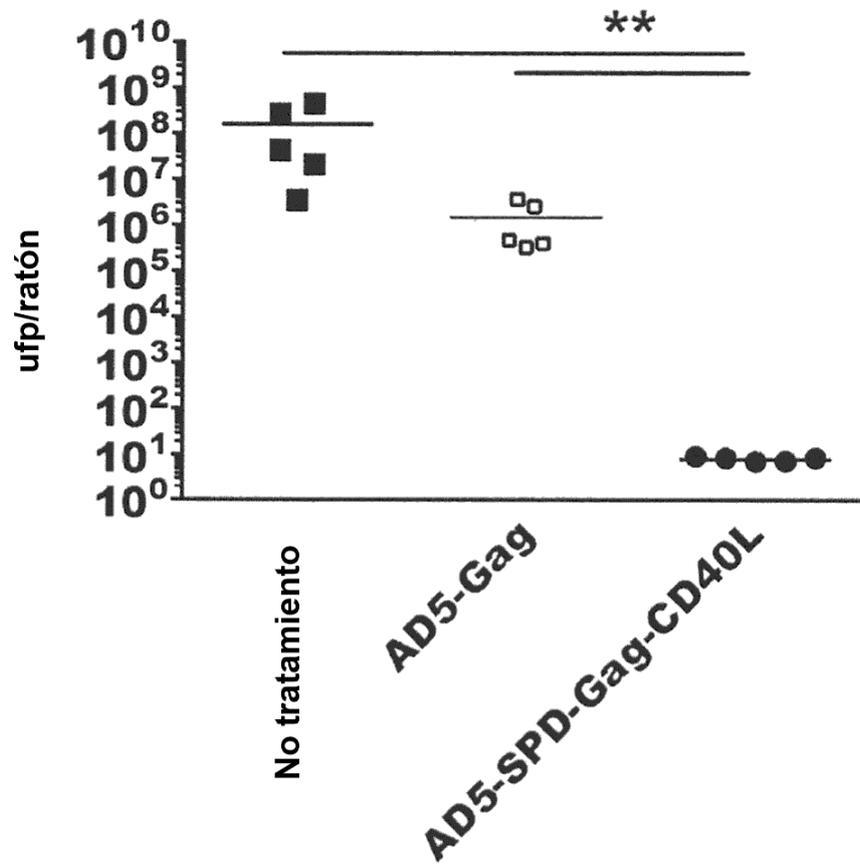


FIG. 12

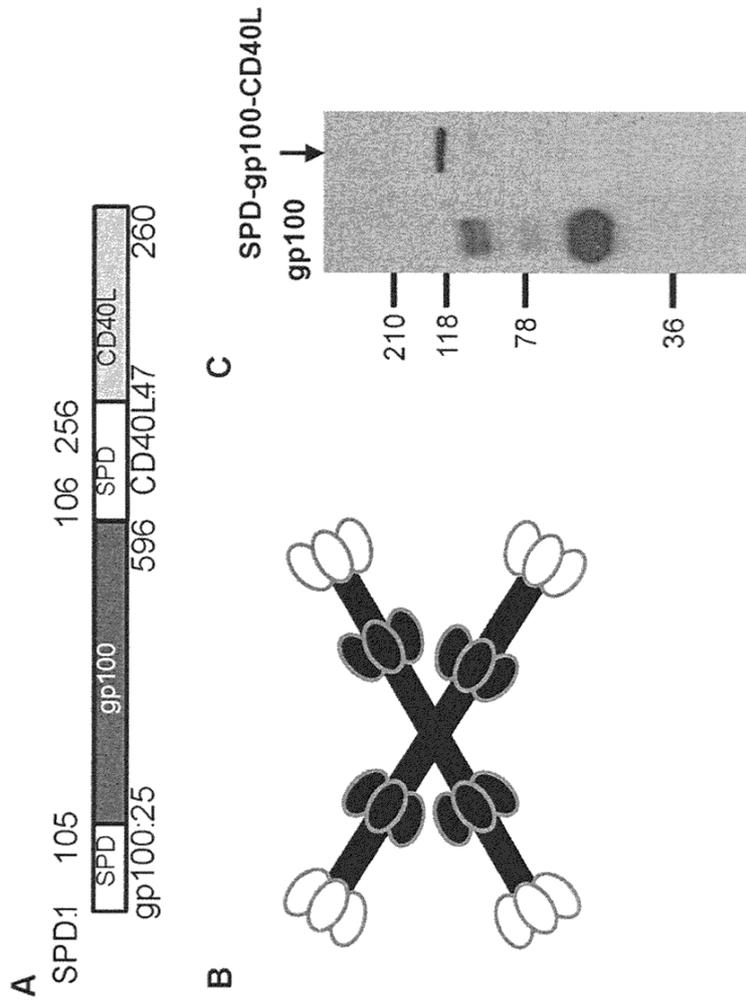


FIG. 13

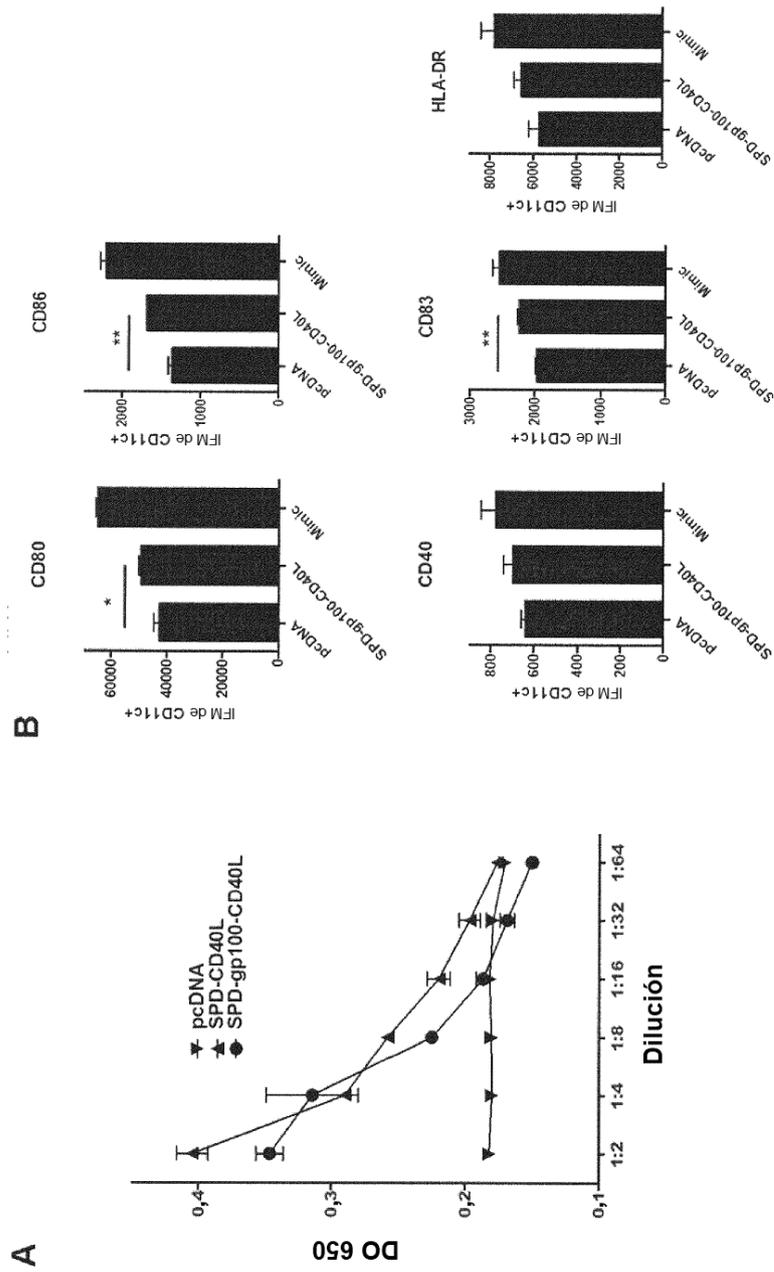


FIG 14

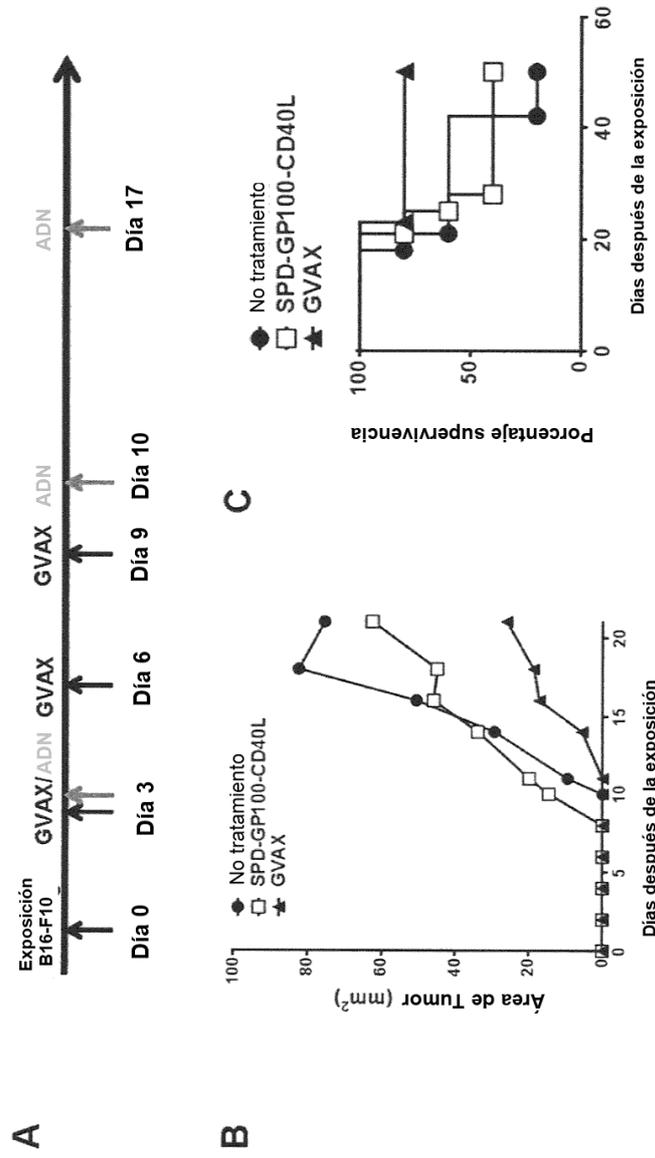


FIG. 15

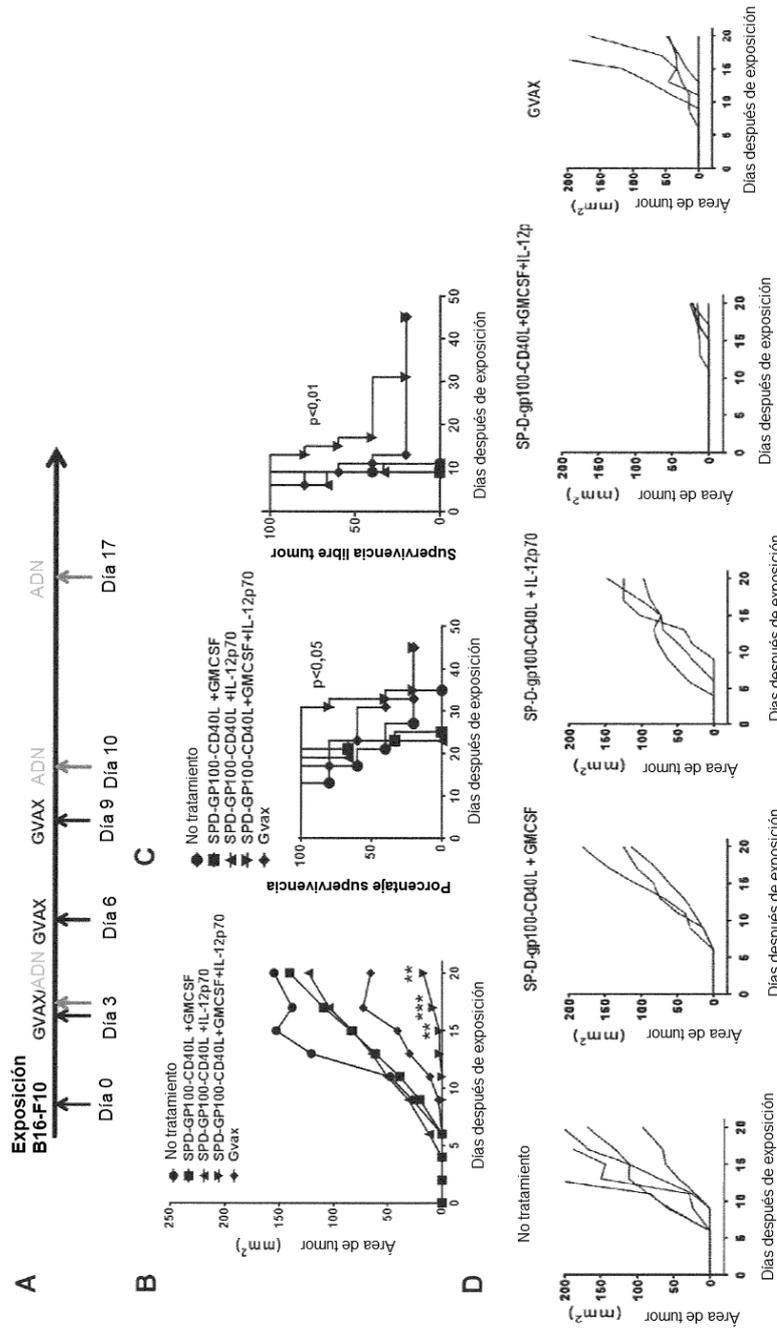


FIG. 16

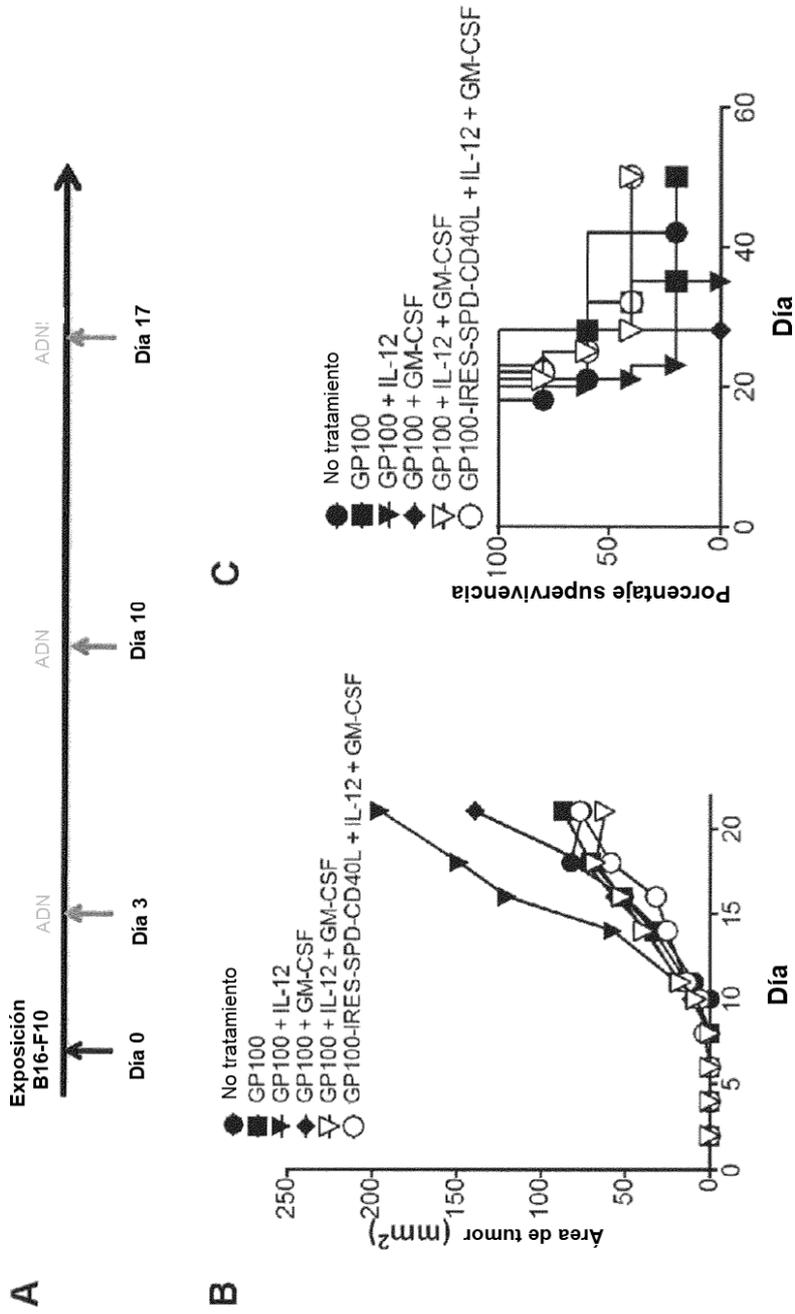


FIG. 17