



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 324 745**

⑯ Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01) **C12N 15/19** (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01) **A61K 51/12** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **97906764 .2**

⑯ Fecha de presentación : **20.02.1997**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0882134**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.1998**

④ Título: **Procedimientos y composiciones para la inmunización genética protectora y terapéutica.**

⑩ Prioridad: **21.02.1996 US 604627**

⑦ Titular/es: **Genetic Immunity Kft.**
Berlini Str. 47-49
Budapest 1045, HU

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.08.2009

⑦ Inventor/es: **Lisziewicz, Julianna y**
Lori, Franco

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.08.2009

⑦ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Procedimientos y composiciones para la inmunización genética protectora y terapéutica.

5 **Antecedentes de la invención**

Muchas de la mayoría de enfermedades mortales y debilitantes que afectan a los seres humanos y a los animales son producidas por virus. La invención descrita en la presente memoria se refiere a la prevención y al tratamiento de varias enfermedades producidas por virus, y en particular a enfermedades producidas por retrovirus. Por ejemplo, la presente invención es aplicable a cánceres tal como la leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, producida por el retrovirus VLTH-1 (virus linfótropo de linfocitos T humano, tipo 1). Este cáncer plantea un problema sanitario principal en Japón y problemas similares en grupos de la población del Caribe, de Sudamérica y de Estados Unidos. Pombo de Olivera *et al.* (1990) *Lancet* 336:987-991; Shermata *et al.* (1992) *Arch. Neurol.* 49:1113. VLTH-1 se ha relacionado también con varios trastornos inflamatorios, tales como el síndrome de Sjögren, en Japón occidental donde la infección por VLTH-1 es endémica (Kaoru *et al.* [1994] *Lancet* 334:1116-1119), y la encefalopatía degenerativa que paraliza las extremidades inferiores (Dixon *et al.* [1990] *West J. Med.* 152:261-267).

Otra enfermedad retrovírica estudiada específicamente en la presente memoria es el SIDA, producido por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana), un tipo específico de retrovirus denominado lentivirus. Recientemente, parece que las mujeres heterosexuales entre las edades de 18 a 24 años son la población que presenta el mayor aumento en seropositividad para el VIH. Debido a que las mujeres infectadas con VIH son la principal fuente de infección para los niños, los expertos informan de que la mortalidad por SIDA en niños aumentará. Kimbal *et al.* (1995) *Annu. Rev. Public Health* 16:253-282, estudiaron el efecto devastador del SIDA epidémico.

25 Los ejemplos de retrovirus que producen enfermedades en animales incluyen el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la leucemia felina (VLFe), el lentivirus T linfótropo felino (denominado actualmente virus de inmunodeficiencia felina (VIF)), descrito por Pedersen *et al.* [1987] *Science* 235:790-793), y la leucemia bovina. Otras enfermedades producidas por no retrovirus, que no obstante están expuestas a la invención descrita en la presente memoria, incluyen el cáncer cervical producido por el papilomavirus humano (PVH), el carcinoma hepatocelular primario producido por la hepatitis B, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo producido por el virus de Epstein-Barr (VEB), las infecciones respiratorias inferiores producidas por el virus del sincitio respiratorio, herpes, viruela, encefalitis, sarampión y gripe.

35 En resumen, los virus son parásitos intracelulares obligatorios que se replican secuestrando los mecanismos celulares del hospedador infectado. Las partículas víricas por lo general incluyen un genoma que comprende unas pocas moléculas de ADN o ARN, o ambas, y un pequeño número de proteínas que forman una cápside o que están presentes como enzimas o proteínas reguladoras. Los virus con frecuencia se clasifican según (1) el tipo de ácido nucleico que constituye el genoma; (2) la estrategia de replicación vírica; y (3) la morfología del virión. La clasificación y nomenclatura víricas están estudiadas en Fenner *et al.* eds., (1993) *Veterinary Virology*, 2^a ed., Academic Press, Inc., San Diego.

40 El cuerpo combate la infección vírica con una combinación de mecanismos inmunitarios celulares y humorales. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) comprenden el arma principal para defenderse contra la infección vírica probada. Específicamente, los CTL CD8⁺ reconocen antígenos asociados con las moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I mientras que los linfocitos T CD4⁺ reconocen los antígenos asociados a las moléculas MHC de clase II. Al principio en el curso de la infección vírica, los anticuerpos específicos prueban un arma importante en la defensa contra el ataque vírico. Aunque no se conocen los mecanismos precisos de cómo los virus neutralizan los anticuerpos, los anticuerpos IgG, IgA e IgM se ha descrito que pueden neutralizar partículas víricas. Por lo tanto el éxito de la vacunación profiláctica con virus de la subunidad, atenuados o destruidos está muy relacionado con la capacidad de la vacuna para estimular las respuestas del anticuerpo. Véase generalmente Abbas *et al.*, [1994] *Cellular & Molecular Immunology*, 2^a ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia.

55 Más específicamente, las vacunas de la subunidad constituidas por proteínas víricas se administran con la esperanza de que la respuesta inmunitaria surgida en las proteínas víricas combata con eficacia la infección vírica. Este modo de vacunación está dirigido a respuestas inmunitarias humorales o generalizadas y por lo general provoca la producción de anticuerpos IgG. Este tipo de anticuerpo permanece principalmente en el torrente sanguíneo del individuo con objeto de prevenir la enfermedad nacida en la sangre. En el caso del VIH-1 por ejemplo, muchas de las vacunas dirigidas a prevenir las infecciones por VIH-1 son dichas vacunas de la subunidad que utilizan la envoltura del VIH-1 recombinante o proteínas del núcleo y se administran por vía intramuscular o por vía subcutánea. Estos métodos de vacuna no han producido respuestas inmunitarias eficaces en modelos de VIH, sin embargo, en parte porque las proteínas clonadas y expresadas seleccionadas no pueden presentar epítopos víricos en un modo auténtico. Letvin (1993) *New Eng. J. Med.* 329(19): 1400-1405. Además, la mutación vírica facilita el escape vírico de las respuestas inmunitarias enfocadas en unos pocos epítopos específicos. Nowak *et al.* (1995) *Nature* 375:606-611.

65 El artículo titulado "Melanoma-specific CTL, generated *in vitro* using dendritic cells expressing melanoma associated antigens" de la 2nd European conference on the Gene Therapy of Cancer, London, U.K., 7-8 de septiembre 1995 por Heemskerk, MHM *et al.* expone la transducción de células dendríticas *in vitro* con vectores retrovíricos que codifican MAGE-1 y tirosinasa, así como el gen marcador lac Z. Se ensaya la capacidad de las células para generar CTL específicos para MAA pero no se describe el trabajo *in vivo*.

Wong *et al.* en *Journal of Immunology* 154 [1995]: 4685-4692 expone la alteración de un virus de la viruela que es conocido por su incapacidad de producir enfermedad en células de mamífero, al incluir un AGS asociado al tumor. Se utiliza una partícula de virus viva como vector para transportar la enfermedad de interés.

5 El documento WO 94/24267 da a conocer la utilización de partículas retrovíricas para la administración génica. Los nucleótidos que codifican un antígeno y un factor coestimulante se incorporan en el vector retrovírico con el fin de obtener una respuesta inmunitaria.

10 Wiskerchen M. *et al.* en *Journal of Virology* 69(1) [1995]: 376-386 exploran la zona de codificación de la integrasa del VIH-1. Las mutaciones afectan a toda la zona de codificación de la integrasa en el VIH-1, y los virus mutantes resultantes se clasifican según su capacidad para reproducirse. Los autores concluyen recomendando que la quimioterapia dirigida a la integrasa del retrovirus puede tener relevancia clínica para la infección por VIH-1 *in vivo*, pero no exponen la aparición de una respuesta inmunitaria en un hospedador.

15 Continuando con el modelo VIH, además de las vacunas subunidad, se han propuesto virus atenuados vivos como vacunas. Sin embargo, los virus atenuados vivos que no pueden replicarse eficazmente *in vivo* no provocan respuestas inmunitarias protectoras (Letvin *et al.* [1995] *J. Virol.* 69:4569-4571). Por el contrario, los virus VIH atenuados vivos del estado de la técnica que pueden replicarse eficazmente *in vivo*, son demasiado peligrosos para utilizarse para vacunas (Letvin [1993] *New Eng. J. Med.* 329(19):1400-1405).

20 25 Un ejemplo específico de una vacuna con microbios vivos atenuada que demostró ser demasiado peligrosa para fines generales de la vacuna se desarrolló contra el VIS del macaco rhesus (VISmac). La atenuación implicaba una eliminación del gen vírico nef, una proteína de 25 a 29 kD situada en el citoplasma de la célula infectada y en la membrana celular (Allan, J.S., *et al.* [1985] *Science* 230:810-813). El VISmac sin nef mantenía la capacidad para integrarse y replicarse. Aunque la vacunación con VISmac con el nef eliminado protegía los monos rhesus en adultos frente a la infección ulterior con VISmac patógeno (Daniel *et al.* [1992] *Science* 258:1938-1941; Almond *et al.* [1995] *Lancet* 345:1342-1344), los monos rhesus jóvenes desarrollaron algunas veces la enfermedad mortal durante la vacunación con el VISmac con nef eliminado. Baba *et al.* (1995) *Science* 270:1220-1221.

30 Además, se ha presentado recientemente (Heath *et al.* [1995] *Nature* 377:740-744) que el VIH-1 acomplejado con anticuerpos neutralizantes es muy infeccioso en presencia de células dentífricas foliculares. Esto explica por qué puede no ser eficaz una estrategia de vacuna tradicional que provoca una respuesta humoral.

35 De este modo, la posibilidad de contraer la enfermedad es realmente el mayor interés relacionado con la utilización de virus atenuados competentes para replicación. Además, en el caso de los retrovirus (especialmente lentivirus), pueden transcurrir años antes de que se comprenda la toxicidad potencial de las vacunas tradicionales. Esto aumenta en gran medida los intereses en seguridad y limita la utilización de vacunas de virus competentes para la replicación. Existe una necesidad urgente de identificar medios seguros y eficaces para combatir las infecciones víricas. Esta necesidad está dirigida a la técnica de inmunización genética de la presente solicitud, que proporciona protección en 40 una variedad de enfermedades.

Breve sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a utilizaciones de construcciones genéticas inmunógenas, a utilizaciones de células dendríticas y a composiciones farmacéuticas para producir inmunidad protectora y terapéutica en infecciones lentivíricas en seres humanos y animales mediante la técnica de inmunización genética. La inmunización genética comprende la expresión de genes que codifican antígenos extraños en los órganos linfoides para la prevención y tratamiento de enfermedades. Como se describe con mayor detalle a continuación, cuando los genes de un lentivirus incompetente para replicación se expresan en los órganos linfoides, preferentemente en células dendríticas, se genera inmunidad mediante respuestas inmunitarias primarias y secundarias debido a la producción de partículas víricas y a la reinfección limitada.

55 La invención, en un primer aspecto, consiste en la utilización de una construcción genética inmunógena que expresa un lentivirus incompetente para la replicación en un órgano linfóide del hospedador, para la preparación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmunitaria en el hospedador al lentivirus.

60 La invención, en un segundo aspecto, consiste en la utilización de una célula dendrítica transducida con una construcción genética inmunógena que expresa un lentivirus incompetente para la replicación en un órgano linfóide del hospedador destinado a la preparación de un medicamento para producir una respuesta inmunitaria en el hospedador al lentivirus.

65 La invención, en un tercer aspecto, es una composición farmacéutica que comprende un dendrocito que ha sido transducido con una construcción genética inmunógena que comprende el ADN plásmido que expresa un virus incompetente para replicación, destinado a la utilización en un procedimiento de inmunización. Los aspectos preferidos son los indicados en las reivindicaciones subordinadas.

En una forma de realización preferida, las utilizaciones de la presente invención implican la transducción de una célula de un hospedador humano o animal con una construcción genética que proporciona en la célula transducida la

capacidad para expresar un virus atenuado. El virus atenuado producido por la célula transducida es infeccioso pero incompetente para la replicación de modo que el virus no es susceptible patogenicidad. Aunque el virus producido por la célula transducida no es patógeno, el virus atenuado provoca una respuesta inmunitaria que puede proporcionar en el hospedador protección contra la infección por el virus natural. Este único resultado se lleva a cabo con los virus atenuados producidos selectivamente por las células en los órganos linfoides del hospedador animal o humano. Ventajosamente, el virus atenuado presenta el tamaño y otras características del virus natural con la excepción de que el virus atenuado no puede patogenicidad. La eficacia de la respuesta inmunitaria resulta maximizada por las características naturales del virus atenuado así como su expresión en los órganos linfoides.

La falta de patogenicidad de los virus atenuados producidos según la presente invención puede llevarse a cabo de varias maneras, pero, como se describe en la presente memoria, las formas de realización preferidas de la presente invención implican la modificación genética del genoma vírico, por ejemplo, eliminación o reducción de la capacidad del virus para replicarse o integrarse de manera productiva. Clonando este ADN vírico incompetente para la replicación, es posible crear una partícula vírica que sea sólo levemente infecciosa. Si se presenta a un hospedador utilizando los procedimientos habituales, dicho virus levemente infeccioso no estimularía una respuesta inmunitaria eficaz capaz de proteger al hospedador contra la prueba de provocación ulterior. Con objeto de resolver esta falta de inmunogenicidad protectora o terapéutica, la presente invención comprende un único medio de mejorar con eficacia la inmunogenicidad de la partícula vírica atenuada presentando estas partículas víricas a los componentes del sistema inmunitario que son responsables de la construcción de la respuesta antivírica. Específicamente, las células dentro de los órganos linfoides se transducen para proporcionar en ellas la capacidad de producir partículas víricas incompetentes para la replicación. Estas partículas víricas son casi idénticas al virus natural desde el punto de vista de tamaño, de las propiedades bioquímicas y de la presentación del antígeno de las proteínas víricas, con la excepción de que el virus atenuado no puede producir infección activa. Aunque el virus atenuado producido por las células que producen virus de la presente invención no puede propagar la infección, se produce suficiente virus para provocar una respuesta inmunitaria eficaz. La capacidad para producir la respuesta inmunitaria deseada es debida a la estructura del virión y a la similitud bioquímica con el virus natural, así como al hecho de que el virus atenuado se produce específicamente en íntima proximidad con las células apropiadas del sistema inmunitario.

Las utilizaciones de la presente invención pueden provocar una respuesta inmunitaria protectora antes de la exposición vírica, o, ventajosamente, después de la exposición vírica para generar una respuesta inmunitaria mejorada. El tratamiento después de la exposición es particularmente ventajoso en el caso de la infección por virus que no compromete la respuesta inmunitaria del hospedador, o en el caso de pacientes no inmunizados en etapas inmunológicamente competentes de la enfermedad.

Tal como se describe con mayor detalle en la presente memoria, la transducción de las células hospedadoras puede tener otras consecuencias muy ventajosas, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la replicación del virus natural en las células transducidas. La protección cruzada contra los virus mencionados puede conseguirse también debido a la presentación del espectro más amplio de los determinantes inmunológicos. De este modo, las utilizaciones descritas en la presente memoria pueden producir respuestas inmunitarias contra virus heterólogos, o incluso producir una respuesta inmunitaria antivírica general. Los procedimientos utilizados en la presente invención son particularmente ventajosos porque producen una respuesta inmunitaria antivírica muy eficaz al minimizar la seguridad de la vacunación o del procedimiento terapéutico. Según la presente invención, actualmente es posible producir con seguridad una respuesta inmunitaria a la totalidad de una partícula vírica sin peligro de producir enfermedad. Además, debido a que se sabe que los virus median muchos tipos de carcinogénesis, pueden utilizarse los procedimientos de la presente invención para tratar o prevenir estas afecciones cancerosas eliminando o reduciendo la infección vírica que es necesaria para el inicio o la evolución de la afección cancerosa. Además, los procedimientos de la presente invención son aplicables para tratar tumores que presentan antígenos reconocibles específicos provocando la respuesta inmunitaria apropiada contra dichos antígenos.

En otra forma de realización de la utilización de la presente invención, la respuesta inmunitaria generada en el animal hospedador por la expresión del virus atenuado, puede mejorarse, dirigirse o modularse introduciendo en las células transducidas una segunda construcción genética que dirige la expresión de un sistema inmunitario que modula la molécula tal como una citocina.

Las utilizaciones de la presente invención pueden aumentar también generalmente la eficacia de las vacunas víricas recombinantes. Por ejemplo, se han hecho sustanciales esfuerzos de investigación para desarrollar vacunas recombinantes utilizando varios poxvirus como vectores víricos. Estos poxvirus pueden ser, por ejemplo, vacunas, viruela aviar, viruela de canarios o viruela porcina. Cuando se utiliza en hospedadores alternativos, o cuando expresan antígenos o baja inmunogenicidad, estas vacunas antivíricas son con frecuencia ineficaces para provocar una respuesta inmunitaria útil. Este problema puede remediararse mediante los únicos procedimientos de vehiculación de la presente invención por los que las células transducidas migran a los órganos linfoides para expresar las partículas víricas. La transducción de las células que migran a los órganos linfoides aumenta en gran medida la eficacia de la respuesta inmunitaria provocada por las construcciones víricas recombinantes. Alternativamente, estos virus inyectados directamente a los órganos linfoides pueden infectar células que presentan el antígeno y producir partículas de virus infecciosas. Dicha inyección *in vivo* puede resolver el problema de la inducción ineficaz por CTL después de la administración intradérmica.

De este modo, las utilizaciones y composiciones de la presente invención son útiles para (a) estimular una respuesta inmunitaria eficaz contra antígenos víricos; (b) inhibir la replicación del virus y la carcinogénesis mediada por virus; (c) generar memoria reactiva cruzada a largo plazo; (d) inmunización activa contra tumores; (e) generar vacunas genéticas seguras.

5 La presente invención combina tanto seguridad como eficacia utilizando virus atenuados que no pueden propagar la infección. Estos virus se hacen eficaces vehiculándolos en seres humanos y animales por otros medios a parte de su propia replicación. Sin embargo, si el virus atenuado puede completar varias rondas de replicación, el virus puede 10 inyectarse directamente en los órganos linfoides. Por consiguiente, los virus son seguros y eficaces para producir inmunidad protectora y terapéutica en seres humanos y animales.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 ilustra la inmunización genética. El ADN que codifica un virus de clase 4 se utiliza para transducir células, preferentemente dendrocitos (DC). Estas células transducidas se transportan a continuación al órgano linfoide, donde las células transducidas expresan el ADN de clase 4 como proteínas y virus y se convierten en células primarias de presentación del antígeno (APC). El virus de clase 4, liberado de las células transducidas, puede actuar como antígeno soluble y también interferir en otras células presentes en el órgano linfoide tales como linfocitos T, macrófagos y dendrocitos. Estas células infectadas se convierten en células secundarias que presentan el antígeno. Tanto las APC 20 primarias como secundarias presentan antígenos víricos de manera auténtica en el contexto del mayor complejo de histocompatibilidad (MHC), concentrado en el órgano linfoide, produciendo de manera eficaz la respuesta inmunitaria del hospedador.

25 Las Figuras 2A-2B ilustran un genoma retrovírico natural, algunos detalles de la proteína integrasa y un ejemplo del gen integrasa atenuado que genera un retrovirus de clase 4. Específicamente, esta mutación da como resultado una proteína integrasa trucada que comienza en el extremo 5' como "natural" y termina en el primer codón de terminación después de la eliminación, por consiguiente la proteína mutante es aproximadamente la mitad de la integrasa natural.

30 Las Figuras 3A-3B representan la patogenicidad de las cuatro clases de virus basadas en su capacidad para replicar en un hospedador dado. Las Figuras 3A-3B se leen juntamente con la Tabla 1. Las clases 1 a 3 han sido introducidas por Baba *et al.* (1995) *Science* 270:1220-1221, y la clase 4 esta introducida en la misma. El virus de clase 1 es un virus natural que replica aproximadamente el nivel umbral de modo que existe epidemia persistente y produce enfermedad en el hospedador. El virus de clase 2 puede ser natural o atenuado de modo que la replicación vírica se produce por encima del nivel umbral, pero puede o no producir enfermedad en el hospedador normal. Los virus de clase 3 35 producen enfermedad en hospedadores cuyos sistemas inmunitarios presentan un umbral inferior. Los virus de clase 4 están atenuados de modo que la replicación es auto limitativa y el virus no puede producir enfermedad incluso en un hospedador con un umbral reducido. Véase el Ejemplo 1, a continuación, para una exposición completa de las Figuras 3A-3B.

40 La Figura 4 representa la construcción del plásmido p239SpSp, que lleva el gen defectuoso que codifica la proteína integrasa truncada.

Breve descripción de las secuencias

45 La SEC. ID. nº 1 es el cebador FL5 utilizado según la presente invención.

La SEC. ID. nº 2 es el cebador FL6 utilizado según la presente invención.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a utilizaciones y composiciones para estimular una respuesta inmunitaria antivírica segura y eficaz en un ser humano o animal. Las utilizaciones de la presente invención comprenden la transducción de células con una construcción genética inmunógena que dirige la expresión de un virus atenuado. Tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a la "transducción" de células significa la transferencia a células de ADN 55 que proporciona en las células la capacidad de producir un virus como se describe en la presente memoria y, en algunos casos, expresar una citocina y/o un antígeno tumoral. Las células transducidas se denominan en la presente memoria células productoras de virus. Por lo general, las células transducidas serían células de un hospedador animal o humano. La construcción de virus atenuado se diseña específicamente para expresar un virus atenuado que no puede producir enfermedad. El virus atenuado es incompetente para replicación. Los virus de integración defectuosa se 60 utilizan preferentemente como virus incompetentes para replicación. Aunque el virus atenuado no es patógeno, su expresión por las células productoras de virus se lleva a cabo de una manera que produce una respuesta inmunitaria muy eficaz y eficaz en el hospedador. La célula productora de virus se diseña para producir virus defectuosos en los órganos linfoides en los que se provocan respuestas inmunitarias contra los antígenos víricos. Como se utiliza en la 65 presente memoria, las referencias a los órganos linfoides incluirían, por ejemplo, ganglios linfáticos, el bazo y el timo. Un aspecto crítico de la presente invención es la capacidad para presentar al sistema inmunitario partículas víricas que son casi idénticas al virus natural con la excepción de las partículas víricas de la presente invención no son patógenas. Ventajosamente, los antígenos víricos se presentan al sistema inmunitario en su configuración natural, facilitando de este modo una respuesta inmunitaria muy eficaz.

En una forma de realización preferida, las partículas víricas no son patógenas porque nunca están presentes en número suficiente como para producir enfermedad y/o no pueden probar una infección automantenida (es decir, virus de clase 4 como se describe a continuación en la Tabla 1 y su texto acompañante). Aunque las partículas víricas producidas según la presente invención no pueden producir enfermedad, se presentan de manera que producen una respuesta inmunitaria eficaz. Específicamente, las partículas víricas se liberan de las células transducidas en proximidad física íntima a las células del sistema inmunitario que son responsables de generar respuestas antivíricas. Al crear partículas víricas que simulan estrechamente el virión natural y al concentrar selectivamente estas partículas de virión no patógenas en las posiciones donde se producen respuestas antivíricas, es posible crear una respuesta inmunitaria muy eficaz y efectiva. Con ventaja, el virus y las células productoras de virus producidas según la presente invención 5 serán eliminadas finalmente del cuerpo por el sistema inmunitario porque (a) el virus no puede establecer la infección y (b) el virus provoca una respuesta inmunitaria antivírica.

Las utilizaciones de la presente invención pueden ser antes de que el hospedador sea infectado con el fin de producir una respuesta inmunitaria que ayudará a prevenir la infección. Alternativamente, o además, las utilizaciones de la 10 presente invención pueden mejorar la respuesta inmunitaria del hospedador una vez que se ha producido la infección vírica. Dicho tratamiento después de la exposición puede ser muy importante, particularmente cuando la infección vírica es la que normalmente produciría una disminución en la respuesta inmunitaria natural del hospedador. La eficacia mejorada de la presente invención para generar una respuesta inmunitaria antivírica se debe en parte a un procedimiento único para vehicular partículas víricas atenuadas dentro del hospedador humano o animal. Específicamente, 15 las partículas víricas no patógenas atenuadas de la presente invención que producen la respuesta inmunitaria terapéutica o preventiva son generadas por células en los órganos linfoides de modo que la liberación de las partículas víricas se produce en la posición dentro del cuerpo humano o animal donde las respuestas antivíricas son generadas por las células del sistema inmunitario. La liberación de las partículas de virus en los órganos linfoides se consigue transducido 20 las células del hospedador de los órganos linfoides (o las células que migran preferentemente a los órganos linfoides) 25 con una construcción genética que produce la expresión del virus atenuado. Como se describe con más detalle en la presente memoria, se prefiere específicamente la transducción de los dendrocitos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la estimulación o dirección de una respuesta inmunitaria específica del hospedador en las células productoras de virus de por lo menos un gen que expresa una molécula de 30 modulación inmunitaria además del material genético que codifica el virus atenuado. Esto crea una célula productora de virus/citocina. Las células productoras de virus/citocina se diseñan para expresar productos génicos en los órganos linfoides. La citocina aumenta y/o influye en el tipo de respuesta inmunitaria generada por el virus atenuado.

Ejemplos de citocinas que pueden utilizarse para aumentar la respuesta inmunitaria o dirigir una respuesta inmunitaria específica incluyen, pero no se limitan a, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, TNF, GM-CSF e IFN. Véase, 35 por ejemplo, Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3539-3543; Noria, A, RH. Rubin (1994) *Biotherapy* 7:261-269; Walt *et al.* (1994) *Stem Cells* 12: 154-168; Kelso, A (1995) *Immunol.Today* 16(8):374-379; Bentwich *et al.* (1995) *Immunol.Today* 16(4):187-191; Garside *et al.* (1995) *Immunol. Today* 16(5):220-223; y las referencias mencionadas en estos artículos. Otros aspectos de la presente invención incluyen la inhibición de la replicación del virus 40 y la carcinogénesis mediada por el virus. En una forma de realización, la inhibición de la replicación vírica es realizada por linfocitos T citotóxicos que pueden destruir las células que expresan cualquier antígeno vírico. Las células citotóxicas son producidas induciendo linfocitos T naturales o con memoria con antígenos expresados en los órganos linfoides. Esta es una propiedad muy ventajosa de la presente invención porque es bien conocido que los virus, por ejemplo, papilomavirus humano, virus de la hepatitis C, VLTH-1 y herpesvirus humano, tipo 8 (VHH-8) (denominando 45 también herpesvirus del sarcoma de Kaposi (VHSK), y VIH-1, pueden mediar en el cáncer cervical y laringeo, en el cáncer de hígado, en la leucemia de linfocitos T del adulto y en el sarcoma de Kaposi, respectivamente. Véase, por ejemplo, Bedi *et al.* (1995) *Nature Medicine* 1:65-68. La inhibición de la tumorigénesis, por consiguiente, puede realizarse destruyendo los antígenos víricos que expresan células independientemente, de si el virus está implicado directa o indirectamente en la formación del tumor.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para generar una vacuna genética segura contra las infecciones víricas. Esto se lleva a cabo como se describió anteriormente mediante la producción de virus atenuados, con o sin citocinas, en los órganos linfoides de un individuo natural. La presentación eficaz del antígeno en los órganos linfoides produce una expresión clonal de linfocitos T específica para el antígeno que son necesarios para manipular un gran 50 número de antígenos extraños. Alguna descendencia de las células que responden al antígeno desarrolla linfocitos T con memoria específicos para el antígeno que inician rápidamente una respuesta inmunitaria secundaria mayor en el momento de la estimulación ulterior.

De este modo, las técnicas de inmunización genética descritas en la presente memoria pueden generar a partir de 55 linfocitos T naturales un gran número de linfocitos D con memoria para muchos o posiblemente todos los antígenos víricos diferentes para evitar la posibilidad de escape antigenético. Esto se consigue mediante la presentación profesional de APC (por ejemplo DC), de todos los epítopos de la proteína vírica para diferentes células inmunitarias en los órganos linfoides, como se describió anteriormente. Además el virus que se produce actúa como antígeno soluble e infecta otras células en los órganos linfoides. El aumento de la respuesta inmunitaria se consigue mediante la reinfección de 60 otras células en los órganos linfoides por los virus atenuados dando como resultado en la presentación del antígeno secundario. Asimismo, la utilización de adyuvantes (por ejemplo, citocinas) o la administración repetida de la vacuna 65 pueden utilizarse para aumentar la respuesta inmunitaria específica.

Esta inmunidad reactiva cruzada de larga duración que puede generarse ha sido descrita por Selin *et al.* *J. Exp. Med.* 179:1933-1943. Este artículo proporciona pruebas de que las células con memoria pueden ser reestimuladas sustancialmente por virus que no son serológicamente reactivos en cruz. Esto es cierto tanto para las respuestas de los linfocitos T como de los linfocitos B. Es conocido que los linfocitos T reconocen péptidos cortos de 8 a 13 aminoácidos y que son reactivos en cruz para variantes del péptido original, así como para complejos MHC/péptido no relacionados. Por consiguiente, la reactividad cruzada de los linfocitos T puede no limitarse a los patógenos relacionados. Otra característica importante de la reactividad cruzada es que los linfocitos T con memoria están presentes en la misma frecuencia tanto en los órganos linfoides como en la sangre, una propiedad que corresponde a una célula necesitada de vigilancia inmunitaria (Lau *et al.* [1994] *Nature* 369:648-652). Por consiguiente, a diferencia de las células naturales, los linfocitos T con memoria están expuestos a antígenos que no están en los órganos linfoides y responden rápidamente a las infecciones. La técnica de inmunización genética de la presente invención genera linfocitos T con memoria contra todos los antígenos víricos presentados en la configuración correcta, no solamente por los dendrocitos sino también por las células secundarias infectadas. En infecciones como por VIH o gripe, un pequeño porcentaje de células con memoria generadas contra los antígenos conservados o que reaccionan en cruz pueden proporcionar protección contra la prueba de provocación ulterior con otro subtipo.

La protección cruzada entre diferentes subtipos de virus es especialmente importante en el caso de la infección por VIH y gripe, en los que muy numerosos subtipos diferentes pueden surgir rápidamente. Las pruebas para protección cruzada entre diferentes subtipos fueron demostradas recientemente por Marlink *et al.*, por consiguiente la inmunización genética con VIH-2 puede proteger contra la infección por VIH-1 (Marlink *et al.* [1995] *Science* 265:1587-1590). Además, como se describe, este tipo de inmunización genética que utiliza un virus completo protegerá contra variantes de VIH con más éxito que las vacunas de subunidad en la técnica.

La respuesta inmunitaria generada por células productoras de virus (o virus/citocina) en los órganos linfoides según la presente invención es una respuesta antivírica completa. Por ejemplo, cuando las células productoras son dendrocitos y el virus atenuado es VIH-1 negativo a integrasa capaz de producir proteínas en las células infectadas, la respuesta inmunitaria puede producirse por los medios siguientes:

- (a) los dendrocitos presentadores del antígeno (células que presentan el antígeno primario) migran con el ADN obtenido en los órganos linfoides donde, en la producción de proteína y virus, estimulan linfocitos T naturales y con memoria y proporcionan señales coestimulantes. Thomson *et al.* (1995) *Transplantation* 59:544-550;
- (a) las células inmunitarias responden a los antígenos víricos y los virus libres producidos *in situ* por los dendrocitos. Por ejemplo, los dendrocitos y macrófagos presentes en los órganos linfoides tienen capacidad para presentar antígenos víricos tanto contra los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺;
- (a) la posición conjunta anatómica del antígeno, las células presentadoras del antígeno (APC) y los linfocitos T en los órganos linfoides, favorecen la iniciación de una respuesta de los linfocitos T. Los mamíferos utilizan linfocitos T citotóxicos y células destructoras naturales para eliminar células y tejidos infectados o si no inmunodeprimidos. Los linfocitos T citotóxicos reconocen los péptidos presentados por las moléculas MHC de clase I y las células destructoras naturales buscan la ausencia de MHC-I, una consecuencia común de infección por virus y transformación maligna;
- (a) el virus atenuado producido por los dendrocitos pueden infectar otras células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos CD4⁺, dendrocitos y macrófagos) en los órganos linfoides. El antígeno vírico será presentado también a las células efectoras;
- (a) el antígeno en los órganos linfoides estimula la producción de citocinas. Estas citocinas desempeñan una función efectora en el linfocito T (por ejemplo, Macatonia *et al.* [1995] *J. Immunol.* 154:5071-5079) y la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos B, median en la inmunidad natural (por ejemplo, interferón, factor inhibidor CB8) y regulan la activación, el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos y la hematopoyesis. Por consiguiente, la producción de citocina(s) junto con el virus atenuado puede aumentar y dirigir la respuesta inmunitaria; y
- (a) el virus atenuado (como antígeno extracelular) y los linfocitos CD4⁺ cooperadores pueden activar los macrófagos para la fagocitosis del antígeno y activar los linfocitos B para la secreción de anticuerpos.

De este modo, la presente invención es útil en la prevención y el tratamiento de infecciones víricas y otras afecciones patológicas incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer. Otro aspecto incluye la combinación de ADN que codifica el virus atenuado con antígenos tumorales. Como la inmunización genética da como resultado la inducción de una respuesta inmunitaria primaria y secundaria potente contra los antígenos expresados en los tejidos linfoides, la respuesta inmunitaria estará también dirigida contra antígenos extraños (como antígenos tumorales) modificada genéticamente en el virus de clase 4. Los materiales y procedimientos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de una amplia gama de infecciones víricas. Están específicamente ejemplificados en la presente memoria los materiales y procedimientos para la prevención o tratamiento de afecciones patológicas de seres humanos o animales producidas por retrovirus producidas incluyendo VIH y VIS. Tal como se utiliza en la presente memoria; la referencia a VIH incluye VIH-1 y VIH-2, a menos que el contexto lo indique de otra manera.

ES 2 324 745 T3

Los ejemplos siguientes ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deberían considerarse limitativos. Todos los porcentajes están expresados en peso y todas las proporciones de mezcla de disolventes se expresan en volumen a menos que se indique de otra manera.

5 Ejemplo 1

Ejemplos de virus infecciosos pero incompetentes para replicación (clase 4)

El virus atenuado utilizado según la presente invención no debe ser patógeno. En una forma de realización preferida, esta falta de patogenicidad será debida a una alteración del genoma vírico que destruye su capacidad para replicarse hasta el infinito. Dichos virus defectuosos para la replicación se obtienen preferentemente por procedimientos de eliminación con objeto de evitar la reversión a virus naturales. Dichos procedimientos de eliminación son bien conocidos en la técnica. Tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a virus atenuados incluye los virus mutantes. En la Tabla 1 y en el texto siguiente se presenta una comparación y definición de la clase 4:

15

Tabla 1

20	Mecanismo de atenuación	Denominación del virus	Replicación por encima del umbral		Enfermedad	
			En hospedador normal	En hospedador coinfectado o inmunodeprimido	En hospedador normal	En hospedador coinfectado o inmunodeprimido
30	1 Ninguno	Patógeno	Si	Si	Si	Si
35	2 Pérdida de patogenicidad	Avirulento	(Si)	(Si)	No	No
40	3 Capacidad disminuida para replicar	Replicación alterada	No	Si	No	Si
45	4 Infeccioso pero incompetente para replicación	Incompetente para replicación	No	No	No	No

Los “Mecanismos de atenuación” 1-3, presentados en la Tabla 1, basados en Baba *et al.* (1995) *Science* 270:1220-1221, ilustran las diversas clases de atenuación vírica demostradas en la técnica, y el impacto de la atenuación sobre la capacidad vírica para producir infección por encima de un nivel umbral. La presente invención introduce virus atenuados de clase 4, descritos con detalle a continuación. Según la hipótesis umbral, propuesta por Baba, la patogenicidad retrovírica se vuelve aparente solamente después que el nivel de replicación vírica sobrepasa el nivel umbral en un hospedador dado. El nivel umbral se define como el nivel de infección por encima del cual se presenta viremia persistente y patogenicidad. Las figuras 3A-3B, basadas en Baba, ilustran el concepto de nivel umbral.

55

Haciendo referencia a la Tabla 1 y a las Figuras 3A-3B, los virus de clase I son virus naturales no atenuados, capaces de replicación por encima del nivel umbral y que producen enfermedad en el hospedador infectado. Los virus de clase 2 carecen de patogenicidad porque, aunque estos virus tienen capacidad para replicar competentemente, no son virulentos en el hospedador. Por lo tanto, “(Si)” en la columna Replicación de la Tabla 1 los virus de clase 3 pueden estar alterados para la replicación por una variedad de medios, pero los factores pueden regular por incremento la replicación vírica y restaurar la virulencia una vez que se sobrepasa el nivel de replicación umbral. Haciendo referencia a las figuras 3A-3B, los virus de clase 3 producen enfermedad en los individuos con umbrales inferiores.

65

Más específicamente, la infección con un virus de clase 1 ó 2 (véase la Tabla 1) produce viremia persistente (estos virus son siempre capaces de replicación por encima del umbral), lo que es un peligro potencial para el hospedador independiente de la patogenicidad del virus (Figuras 3A y 3B). Por ejemplo, los retrovirus se integran en el genoma del hospedador aleatoriamente, por consiguiente la posibilidad de activar un oncogén por integración es alta cuando existe un alto nivel de replicación. Y aunque los hospedadores normales pueden controlar la replicación de los virus de clase

3 (Figura 3A), este mecanismo no es específico, para VIH, VIS o para los virus mutantes. Por ejemplo, la infección por citomegalovirus humano (CMV) produce una viremia transitoria en un hospedador normal; sin embargo, en pacientes después del trasplante de médula ósea o en SIDA (donde el sistema inmunitario está deprimido), el umbral de control de replicación del virus está disminuido (Figura 3B). Por consiguiente, el CMV empezará por replicar por encima del umbral y producirá enfermedad grave.

Aunque, haciendo referencia a la Tabla 1, podría parecer inicialmente que los virus atenuados en las clases 2 y 3 pudieran ser adecuados para la inmunización genética, lo contrario es así debido a que estos virus pueden replicarse hasta el infinito en condiciones óptimas (por ejemplo, cultivo tisular, paciente inmunodeficiente, recién nacido). Por ejemplo, un mutante de clase 3 de VIS con los genes nef y vpr eliminados produce SIDA en recién nacidos de macaco rhesus que presentan un umbral inferior a los adultos, véanse las Figuras 3A-3B. Los virus de clase 3 son así relativamente inseguros para la inmunización genética. Asimismo, los virus de clase 2 son relativamente inseguros para la inmunización genética porque puede desencadenarse virulencia por infección secundaria por un virus virulento. Por ejemplo, aunque el virus avirulento de la leucemia murina de Rauscher (VLR) presentaba protección contra VLR a baja dosis después de la inoculación con un VLR de clase 2 farmacológicamente atenuado, los ratones infectados conjuntamente con el virus de la leucemia de ratón virulento a alta dosis desarrollaron la enfermedad por VLR. Los virus de clase 2, supuestamente avirulentos, no obstante no protegen contra la prueba de provocación vírica a alta dosis y tampoco son demasiado peligrosos para vacunas porque la virulencia residual puede manifestarse. Esta virulencia residual puede ser desencadenada por varios mecanismos incluyendo la infección conjunta, la pérdida de inmunocompetencia y el envejecimiento. De este modo, las estrategias de vacuna de la técnica anterior basadas en virus atenuados con microbios vivos continúan planteando peligros graves.

Los virus de clase 4 no están descritos por Baba, pero se introducen como parte de la invención descrita en la presente memoria. Un aspecto de la invención reivindicada conlleva la generación y presentación de virus de clase 4 que están atenuados para permanecer infecciosos por debajo del nivel umbral debido a que son incompetentes para la replicación. En los virus de clase 4 la replicación está autolimitada, lo que significa que pueden producirse cero a varios ciclos de replicación; la replicación no es infinita y permanece por debajo del nivel umbral de la enfermedad de modo que el paciente no contrae la enfermedad. Los virus de clase 4 son también capaces de infectar células pero la infección es incapaz de propagarse en una medida significativa debido a las capacidades de replicación incompetente. Los virus de clase 4 están genéticamente modificados de modo que no pueden sobrevivir en la naturaleza. Además, la infección por virus de clase 4 nunca produce viremia persistente. Los virus de clase 4 no pueden replicarse por encima del umbral, incluso si el umbral es el mínimo (por ejemplo, condiciones óptimas *in vitro*).

Debido a la naturaleza limitada de su infección, los virus de clase 4 deben presentarse a los órganos linfoides con objeto de efectuar una respuesta inmunógena protectora. Significativamente, los virus de clase 4 se construyen de tal manera que es imposible escapar de la inmunidad y volver a la virulencia, a diferencia de los virus de clase 2 y clase 3. A continuación se explica con mayor detalle la generación y utilización de los virus de clase 4. Resulta preferido que las células transducidas produzcan un nivel elevado de virus de clase 4 en los órganos linfoides. Esto puede conseguirse por el propio elemento activador/potenciador del virus, o estos elementos pueden sustituirse por un potenciador más patente (por ejemplo, potenciadores CMV, SV40) para activar la expresión génica en las células transducidas. El objetivo consiste en maximizar la cantidad de partículas de virus en las células transducidas, lo que produce una presentación del antígeno primario y secundario más potente.

Ejemplo 2

Retrovirus con integrasa defectuosa

En el caso de retrovirus (por ejemplo, VLTH, VIH), el virus atenuado se selecciona preferentemente para que sea de integración defectuosa para reducir la patogenicidad y aumentar la seguridad. La utilización de dicho mutante en la invención es importante porque, hasta la fecha, ningún retrovirus ha resultado ser patógeno en ausencia de integración. Sakai *et al.* (1993) *J. Virol.* 67(3):1169-1174. Un virus con integrasa defectuosa puede, sin embargo, expresar todas las proteínas víricas en forma natural excepto la integrasa modificada (que también puede presentar epítopos). Stevenson *et al.* (1990) *J. Virol.* 64(5):2421-2453. Utilizando virus con integrasa defectuosa la información genética se perderá eventualmente por división celular, muerte celular y la respuesta inmunitaria del paciente.

La atenuación debe ser lo bastante significativa para impedir la mutación vírica u otra escapatoria. En particular, una mutación puntual es suficiente para efectuar la pérdida deseada de competencia de replicación (Cara *et al.* [1995] *Virology* 208:242-248), todavía ésta no resulta preferida debido al riesgo de que el virus podría mutar para generar un péptido funcional. Por consiguiente, preferentemente, la mutación en el gen comprendería una inserción o eliminación de por lo menos tres pares de bases, y más preferentemente por lo menos cien pares de bases, siempre que se mantenga el nivel deseado de replicación.

Los virus con replicación defectuosa que contienen una integrasa parcial o completamente destruida pueden construirse de varias maneras diferentes:

- 65 (a) En una forma de realización preferida, la integrasa está eliminada en 3' o por lo menos una sección próxima al extremo 3' se elimina para colocar el extremo 3' fuera del marco de lectura para generar una proteína integrasa trunca. Si la respuesta inmunitaria protectora requiere expresión génica también en las células

diana infectadas, se prefiere una mutación “fuera del marco” que destruye el extremo 3’ de la integrasa. Esta mutación elimina el punto activo de la integrasa así como el punto de fijación del ADN, y por consiguiente la proteína integrasa no se unirá al ADN no integrado, permitiendo así la expresión génica y la producción de proteínas tras la infección de las células diana. Véase Cara *et al.* (1995) *Virology* 208:242-248; Stevenson *et al.* (1990) *J. Virol.* 64:2421-2425. El virus de clase 4 resultante no se integrará después de la infección pero será capaz de expresar una cantidad limitada de proteínas víricas en las células infectadas. Por consiguiente, su replicación será autolimitativa: los virus de clase 4 interrumpen la replicación después de varios ciclos, incluso en condiciones óptimas. Esta estrategia genera una presentación potente del antígeno primario en las células transducidas y también una presentación potente del antígeno secundario de las células infectadas debido a la expresión vírica del gen, que es óptima para la inmunización genética. Una atenuación similar puede utilizarse con otros retrovirus y onco-retrovirus.

- 5 (b) La mutación “en el marco”, conservando el extremo 3’ de la integrasa (LaFemina *et al.* [1995] *J. Virol.* 66 (12):7414-7419, Sakai *et al.* (1993) *J. Virol.* 67(3):1169-1174; Wiskerchen, M., M.A. Muesing (1995) *J. Virol.* 69:376-386) produce virus defectuosos para replicación e integración. Estos virus de clase 4 pueden infectar células pero no pueden expresar eficazmente proteínas tras la infección de las células diana. La utilización de estos virus para inmunización genética produce una presentación eficaz del antígeno primario y también una presentación del antígeno secundario debido a la infección. Sin embargo, la presentación del antígeno secundario en las células infectadas cabe esperar que sea menos eficaz que la de las células que están infectadas y expresan proteínas víricas (véase anteriormente).
- 10 (c) La eliminación en 5’ del gen con integrasa puede utilizarse también para producir un retrovirus negativo a integrasa. Sin embargo, las eliminaciones en 5’ generan una proteína muy inestable. Ya que la integrasa retrovírica se genera a partir de una poliproteína precursora junto con la transcriptasa inversa, es de esperar que el precursor sea también inestable. Esta inestabilidad de la proteína puede reducir la eficacia de la producción del virus por las células transducidas, y por consiguiente influir en la eficacia de la inmunización genética.
- 15 (d) Otra manera de generar VIH-1 de clase 4 que no puede integrarse consiste en eliminar el gen vpr. Los mutantes con vpr defectuosos pueden solamente replicarse de modo limitado en los linfocitos primarios humanos y no en los macrófagos porque el producto del gen vpr es importante para la integración.
- 20

Varios mutantes de integrasa se han descrito en la bibliografía (véanse las referencias mencionadas en Cara *et al.* [1995] *Virology* 208:242-248) que no pueden integrarse y, por consiguiente, no pueden replicarse. Como estos virus pueden infectar las células pueden clasificarse supuestamente como virus de clase 4. Por ejemplo, Cara *et al.* describieron un VIH-1 negativo a integrasa, que presenta una mutación puntual y puede replicarse de manera limitada en macrófagos humanos primarios pero no en linfocitos T. Como se describió anteriormente, sin embargo, la forma de realización preferida comprende un mutante por eliminación, no un mutante puntual (es decir menos seguro) que presenta replicación autolimitada en células inmunitarias (macrófagos, dendrocitos o linfocitos T). Esto presenta ventajas sobre la técnica anterior porque el virus atenuado no puede revertir al tipo natural. Además, en la bibliografía no se ha descrito el crecimiento en dendrocitos de virus con replicación defectuosa o con integrasa defectuosa. Asimismo, la replicación autolimitativa de un nuevo virus en los dendrocitos es una nueva característica de los virus de clase 4 para su utilización en la presente invención. Por último, en la bibliografía no se han descrito virus de clase 4 mutantes capaces de generar respuesta inmunitaria cuando se expresan en los órganos linfoideos.

Ejemplo 3

Retrovirus con gag defectuoso

50 Un ejemplo de retrovirus de replicación defectuosa que pueden estimular una respuesta inmunitaria protectora según la presente invención son los virus con gag defectuoso. El gag es procesado por la proteasa vírica en varias proteínas estructurales. Al generar mutaciones por eliminación dentro del dominio de la cápside del gen gag, se destruye la formación de la partícula madura pero se conserva la expresión del gen. Un mutante de gag trans-dominante de VIH-I fue descrito por Trono *et al.* (1989) *Cell* 59:113-120. Sin embargo, ninguna técnica anterior sugiere su utilización en la presente invención. Este virus puede infectar células pero no puede replicarse en las células diana. Además, si un virus natural infecta las células que contienen virus mutante, el virus mutante puede bloquear la replicación del virus natural. En el caso de individuos infectados por VIH-I, que producen dichos virus mutantes con replicación defectuosa en los órganos linfoideos según la presente invención no solamente genera una respuesta inmunitaria, sino que también bloquea la replicación del virus natural. Por consiguiente, la carga vírica en los órganos linfoideos de individuos infectados disminuye, permitiendo responder al sistema inmunitario.

Ejemplo 4

Otros retrovirus atenuados de clase 4

65 Otros virus VIH atenuados de clase 4 que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, env defectuoso, proteasa defectuosa, rev defectuoso, pol defectuoso, tat defectuoso (Beale (1995) *Lancet* 345:1318-1319) y virus con gp41 mutante.

5 El virus linfótropo del linfocito T humano de tipo I (VLTH-I) persiste muchos años en individuos infectados pero a diferencia del VIH-1 solamente una minoría de ellos desarrolla la enfermedad (leucemia de linfocitos T del adulto o paraparesis espástica tropical). Existe un alto grado de heterogeneidad de la secuencia intraaislada en el VLTH-I, aunque la variación de la secuencia entre pacientes es pequeña en comparación con VIH-I. La organización genómica de VLTH-I es similar a la del VIH, por consiguiente el VLTH-I con integrasa defectuosa puede ser construido por cualquier virólogo molecular como se describe para el VIH.

10 Asimismo, otros genes tales como gag, pol, env, rex y tax pueden modificarse para generar un virus de clase 4. Aunque algo diferentes, todas las proteínas integrasa de retrovirus comparten estructuras y dominios similares. Por consiguiente, las mismas consideraciones ilustradas para VIH-I se aplican para otros retrovirus incluyendo no solamente el VIH-2 sino también el virus de la leucemia bovina, el virus de la leucemia felina, el virus de la inmunodeficiencia felina, etc.

15 Ejemplo 5

15 *Otros virus atenuados de clase 4 (Referencia)*

20 Los virus no retrovíricos que pueden atenuarse para fijar el modelo de clase 4 incluyen los virus del herpes, los virus de la gripe y los virus de vacuna (VV). Existe la necesidad de desarrollar virus de clase 4 para terapia inmunitaria. Por ejemplo, se han realizado esfuerzos, sin éxito hasta hace poco, para crear una vacuna atenuada antivírica del sincitio respiratorio. Hsu *et al.* (1995) *Vaccine* 13(5):509-515. Aunque Hsu *et al.* han desarrollado aparentemente un virus atenuado sensible a la temperatura, este virus permanece sin caracterizar genéticamente. Un método mejor sería diseñar un virus de clase 4 como se expuso anteriormente.

25 Generalmente, los virus con ARN de clase 4 pueden construirse por modificación del gen con polimerasa. Biswas *et al.* (1995) *J. Virol.* 68:1819-1826 demostraron que las polimerasas víricas contienen cuatro motivos conservados críticos para la función de fijación del cebador. La alteración genética de uno o más de estos dominios produce virus de ARN, incluyendo virus de la gripe, retrovirus, virus I-A de levadura y polimerasas de poliovirus alteradas; por consiguiente, los virus de la descendencia son incompetentes para replicación.

30 35 Los herpes virus que pueden atenuarse para su utilización para la inmunización genética incluyen el virus del herpes simple (VSH), el virus de la pseudorabia y el virus del herpes alfa. Específicamente, Cheung y colaboradores han desarrollado un virus incompetente para replicación que es sólo levemente infeccioso en cerdos. La atenuación implicaba la eliminación de las partes que codifican el ADN de dos productos génicos: la proteína precoz (EPO) y el transcripto de latencia prolongada (LLT). Cheung *et al.* (1995) *Ann. J. Vet. Res.* 55(12):1710-1717.

40 45 Asimismo, Farrel y colaboradores han desarrollado un virus de herpes simple humano vivo atenuado de tipo 1 capaz de sólo una única ronda de replicación, y, por consiguiente, carecen de potencial patógeno. Este virus atenuado carece de la glucoproteína H(gH) esencial y puede solamente propagarse en una estirpe celular que proporciona gH en trans. Con objeto de efectuar la inmunización, el virus debe propagarse *in vitro* y a continuación inocularse en el presente animal. Farrel *et al.* (1994) *J. Virol.* 68:927-932. Según la invención descrita en la presente memoria, el ADN que codifica el virus que carece de gH, o preferentemente un virus con gH defectuoso, puede introducirse en las células que migran a los órganos linfoides, donde la única ronda de replicación produce un virus casi completo que es presentado con ventaja al sistema inmunitario.

50 55 Alternativamente, los científicos han buscado otros virus de tipo 1 del herpes simple humano con replicación defectuosa para vacunas. Por ejemplo, Morrison *et al.* (1994) *J. Virol.* 68(2):689-696 utilizó VSH con replicación defectuosa (clase 4) portador de mutaciones en los genes esenciales que codifican la proteína 8 (ICP8) de la célula infectada o ICP27. Se inmunizaron ratones con una dosis elevada de virus mutante por inoculación en la cola. Aunque dichos virus han proporcionado inmunidad en los ratones, este tipo de inmunización no proporcionó protección contra la replicación del virus aguda en los ojos ni en el ganglio del trigémino. Según la invención descrita en la presente memoria, el ADN que codifica el VSH de clase 4 se introduciría en las células que migran a los órganos linfoides, donde la replicación del virus y la presentación del antígeno provocarían potente inmunidad antivírica.

60 65 Análogos a estos ejemplos, basados en similitud de secuencia y funcional de los herpes virus, otros herpes virus pueden convertirse en virus de clase 4 y ser producidos en los órganos linfoides. Por ejemplo, la infección productiva con VHH-8 (VHSK) fue demostrada recientemente en células de sarcoma de Kaposi (células SK) (clásicas, después del trasplante y SIDA asociado), confirmando la prueba epidemiológica de la etiología infecciosa del SK. Puede utilizarse una inmunización genética, según la presente invención, con VHH-8 de clase 4 para proporcionar protección contra el sarcoma de Kaposi. Otro ejemplo de herpesvirus es la infección por el citomegalovirus humano (VMCH) que produce numerosos síndromes clínicos en individuos inmunodeprimidos, algunos de los cuales ponen la vida en situación de riesgo. Estas infecciones pueden atravesar la placenta e infectar un feto en el útero, produciendo defectos congénitos en el nacimiento. La inmunización genética con VMCH de clase 4 (que puede realizarse mediante eliminaciones de genes responsables de la replicación del ADN vírico, por ejemplo, ribonucleótido reductasa, timidina-cinasa, polimerasa) puede utilizarse para proporcionar protección a estas enfermedades.

Los papilomavirus son pequeños virus tumorales con ADN que están asociados a epitelomas, papilomas escamosos o fibropapilomas dependiendo del hospedador y del tipo de papilomavirus específico. A pesar del oncogén

codificado con potente actividad de transformación, los papilomavirus por lo general provocan hiperplasias epiteliales discretas que persisten durante muchos meses hasta años. Sólo ocasionalmente hacen cambiar las lesiones benignas producidas por papilomavirus a un crecimiento progresivo o se convierten en neoplasia maligna (Howell *et al.* [1988] *Am. J. Med.* 85:155-158). Los papilomas en raras ocasiones mejoran espontáneamente (Kreider *et al.* [1968] *Cancer Res.* 23:1593-1599), indicando que el sistema inmunitario puede reconocer células infectadas. De este modo, las células epiteliales infectadas por papilomavirus no pueden provocar una respuesta inmunitaria esterilizante. La invención descrita en la presente memoria resuelve este problema produciendo papilomavirus mutante en los órganos linfoides donde puede generarse una potente respuesta inmunitaria. Además, estudios recientes han demostrado que el producto del gen E1 codificado por el virus es esencial para la síntesis de ADN vírico en el papilomavirus bovino (BPV) (Bonne-Andrea *et al.* [1995] *J. Virol.* 69:2341-2350). De este modo, un VPB de clase 4 puede construirse para la inmunización genética por mutación del gen E1 y eliminación de los oncogenes transformadores.

Otros virus utilizados en las presentes estrategias de la vacuna con efecto limitado podrían alcanzar nueva eficacia si se liberan en los órganos linfoides como se describe en la presente memoria. En particular, los poxvirus incompetentes para la replicación utilizados como vacunas subunidad presentan poca o ninguna eficacia reproducible. Sin embargo, el hospedador de amplio espectro y la capacidad para expresar múltiples genes hace a los vectores del virus de la vacuna adecuados para la inmunización genética. La inoculación directa de dichas vacunas a base de vacuna basada en las vacunas en la piel no ha generado una respuesta protectora reproducible o inmunitaria eficaz. Por ejemplo, Gallimore *et al.* describieron la inmunización de monos con virus de vacuna recombinante que llevan un gen *SN* (1995 *J. Nature Medicine* 1167-1173). A pesar de la triple introducción de grandes cantidades de virus de la vacuna por escarificación, los animales inmunizados idénticamente preparan cantidades diferentes de respuestas a CTR. Por consiguiente, la inmunización protectora no puede conseguirse de esta manera. La introducción de estos virus en células que se trasladan a los órganos linfoides y la producción de estos virus aumentaran la potencia de la respuesta inmunitaria. Este virus recombinante puede transportar cualquier gen extraño por ejemplo, antígeno tumoral, para generar, por ejemplo una respuesta inmunitaria antitumoral. El mecanismo es similar al descrito para el VIH, anteriormente, pero puede ser más potente porque la vacuna infecta todos los tipos de células, por consiguiente puede generar más APC secundarios. De este modo, la respuesta inmunitaria se generaría contra la vacuna así como contra el antígeno (o antígenos) extraño(s) clonado(s) en el vector del virus de la vacuna. Los vectores poxviricos no replicativos han sido ya creados pero no para su utilización en la presente invención, véase, por ejemplo, Radaelli *et al.* (1994) *Vaccine* 12:1110-1117, Tartaglia *et al.* (1992) *Virology* 188:217-232; Taylor *et al.* (1991) *Vaccine* 9:345-358.

Los virus naturales que no infectan de manera productiva células en los órganos linfoides son también virus de clase 4, si su producción está limitada en los órganos linfoides. La expresión génica del ADN transducido de estos virus puede generar también la respuesta inmunitaria requerida en ausencia de patogenicidad. Sin embargo, por razones de seguridad se sugiere que se produzcan virus incompetentes molecularmente para la replicación.

Ejemplo 6

Combinación de virus atenuados de clase 4 con citocinas

El ADN que codifica un virus de clase 4 puede modificarse genéticamente para expresar por lo menos un gen que codifica una molécula de modulación inmunitaria además del material genético que codifica el virus atenuado. Este crea una "célula productora de virus/citocina". Ejemplos de citocinas que pueden utilizarse para aumentar la respuesta inmunitaria o dirigir una respuesta inmunitaria específica, incluyen, pero no se limitan a, IL-1, IL-2, EL-3, IL-4, EL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-16, TNF, GM-CSF, IFN y quimiocinas, tales como RANTES y MIP1. Véanse, por ejemplo, Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3539-3543; Noria, A., RH Rubin (1994) *Biotherapy* 7:261-269; Wolf *et al.* (1994) *Stem Cells* 12:154-168; Celso A. (1995) *Immunol. Today* 16(8):371-379; Bentwich *et al.* (1995) *Immunol. Today* 16(4):187-191; Garside *et al.* (1995) *Immunol. Today* 16(5):220-223; Cocchi *et al.* [1995] *Science* (Dic. 1995), y las referencias citadas en estos artículos.

En el caso de la enfermedad producida por infección retrovírica (por ejemplo, VIH) presenta particulares ventajas un virus con replicación defectuosa que debe ser producido por las células productoras de virus en los órganos linfoides. Por ejemplo, VIH-1, VDI-2, VIF o *SN*, pueden infectar en los linfocitos T CD4⁺, macrófagos y dendrocitos. Tras la interiorización y la transcripción inversa de la construcción del virus de clase 4 de la presente invención, las células diana linfoides soportan solamente la replicación mínima del virus defectuoso. Por lo tanto, la producción de retrovirus intactos en los órganos linfoides ricos en citocina no provoca una respuesta inmunitaria contra los antígenos víricos. La naturaleza exacta de esta respuesta inmunitaria puede modularse según la presente invención basándose en la naturaleza de las células productoras de virus y el modelo de citocina presente en los órganos linfoides. Por consiguiente, la naturaleza de la respuesta inmunitaria puede ser influida por la introducción conjunta de un gen de citocina en las células productoras de virus. Por consiguiente, estas células producen en los órganos linfoides virus atenuados y citocinas conjuntamente, favoreciendo de este modo un tipo específico de respuesta inmunitaria contra el virus. Por ejemplo, el gen que codifica a IL-12 ha sido clonado y expresado *in vitro*. Se ha demostrado que los dendrocitos que producen IL-12 potencian las células Th1 productoras de IFN en los linfocitos T CD4+. Macatonia *et al.* (1995) *J. Immunol.* 154:5071-5079. Pueden utilizarse técnicas convencionales para clonar el gen para IL-12 en el ADN que codifica el virus de clase 4 descrito anteriormente de modo que las células transducidas con este ADN expresarán también a IL-12. La expresión de IL-12, junto con el virus de clase 4, en los órganos linfoides potencia la respuesta inmunitaria ulterior que implica a las células Th. Esta técnica es aplicable con cualquier gen de citocina clonado, como se apuntó anteriormente. Además, se ha propuesto la transferencia de genes que codifican citocinas en

linfocitos y células tumorales (Schmidt-Wolf (1995) *Immunol. Today* 16(4):173-175), pero la combinación del gen de citocina con el virus de clase 4 y su producción en el órgano linfóide, como se contempla en la presente memoria se demostrará aún más ventajoso como procedimiento de mejora de la inmunización genética.

5 Ejemplo 7

Combinación de virus atenuado de clase 4 con antígenos tumorales

Como se describió anteriormente la presente invención sirve para generar una respuesta inmunitaria antivírica. 10 Otro aspecto de la presente invención incluye la combinación de ADN que codifica el virus atenuado con antígenos tumorales. Como la inmunización genética produce provocación de una respuesta inmunitaria potente contra los antígenos expresados en los tejidos linfoides, la respuesta inmunitaria puede dirigirse también contra los antígenos extraños modificados genéticamente en un virus de clase 4. Todas las células tumorales expresan genes, cuyos productos se requieren para la transformación maligna. Incluso después de la transformación, la formación del tumor 15 es con frecuencia el resultado de una respuesta inmunitaria ineficaz. Es asimismo bien conocido que una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz puede producir regresión del tumor. Las células tumorales que expresan antígenos que provocan una respuesta inmunitaria en el hospedador se ha demostrado en ambos modelos animales y en pacientes humanos de cáncer. Véase generalmente Abbas *et al.*, *supra en. págs.* 357-375. Por consiguiente, los virus de clase 4 pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria antivírica que a su vez genera inmunización anticáncerosa. 20 Los ejemplos de dichos antígenos incluyen MAGE-1, presentado en el 50 por ciento de los melanomas y el 25 por ciento de carcinomas de mama humanos; las proteínas del p21ras con mutación puntual en la posición 12 presentadas en el 10 por ciento de los carcinomas humanos; el producto p21 de las reconfiguraciones bcl/abl, presentado en la leucemia mielógena crónica; los productos génicos E6 y E7 del papilomavirus humano, presentados en el carcinoma cervical humano; y el producto genético EBNA-1 del VBE presentado en el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo. Dos antígenos relacionados con el cáncer humano caracterizados más profundamente son la fetoproteína alfa y el antígeno carcinoembrionario. Recientemente, Grabbe *et al.* han informado que la presentación diferenciada 25 de antígenos tumorales por las células presentadoras del antígeno puede ser crítica para la eficacia de las respuestas inmunitarias del tumor (Grabbe *et al.* [1995] *Immunol. Today* 16(3):117-121).

30 En una forma de realización preferida de la presente invención, los dendrocitos transducidas por un ADN que codifica un virus de clase 4 provocaron eficazmente una respuesta inmunitaria. El ADN que codifica el virus de clase 4 puede ser modificado genéticamente para expresar también uno o más antígenos tumorales. Por consiguiente, las células que expresan y presentan los antígenos en los órganos linfoides producen eficazmente la respuesta inmunitaria del hospedador contra los tumores que llevan este o éstos antígeno(s) además de la respuesta inmunitaria contra el virus atenuado. Los genes de citocina clonados también en los virus de clase 4 con el antígeno tumoral pueden influir y aumentar la respuesta inmunitaria. Un ejemplo, no dentro del alcance de la invención, para los virus de clase 35 4 que pueden contener antígenos tumorales es el virus de la vacuna recombinante. Este virus es fácil de manipular para expresar de manera eficaz genes extraños; también su tropismo amplio hace posible generar no solamente células primarias presentadoras del antígeno sino también células secundarias presentadoras del antígeno. Otro ejemplo 40 consiste en la utilización del VIH negativo a la integrasa. En este virus, nef es una proteína precoz muy expresada. La introducción de un antígeno tumoral en el marco de lectura nefopen y/o en la integrasa eliminada puede proporcionar no solamente respuestas antivíricas sino también inmunitarias antitumorales.

Ejemplo 8

45 *Células transducidas*

Las células productoras de virus de la presente invención son preferentemente células transducidas. Las células transducidas transportan el ADN que codifica el virus atenuado de clase 4, y opcionalmente además el ADN vírico, 50 la(s) citocina(s) que codifica(n) el material genético y/o el/los antígeno(s) tumoral(es), en los órganos linfoides donde se expresa el ADN que codifica el virus atenuado, la citocina y/o el antígeno tumoral. La citocina y el ADN que codifica el antígeno tumoral se introducen preferentemente para generar células productoras presentadoras del antígeno secundario o de citocina. Sin embargo, esto no es necesario. La citocina o el ADN del antígeno tumoral pueden introducirse también en las células productoras de virus en un plásmido separado e independiente. Asimismo, las 55 células productoras de virus pueden mezclarse con células productoras de citocinas para conseguir el mismo aumento de la respuesta inmunitaria.

En una forma de realización preferida de la presente invención, las células que se transducen con alguno de los virus atenuados mencionados anteriormente, incluyendo, por ejemplo, virus con integrasa defectuosa o de replicación 60 defectuosa, son las células de los órganos linfoides o son células que migran preferentemente a los órganos linfoides. La transducción de estas células presenta ventajas específicas porque los órganos linfoides son el punto principal de la inducción de defensas naturales del hospedador contra las infecciones víricas. En una forma de realización particularmente preferida, las células transducidas son los dendrocitos. Sin embargo, varios tipos diferentes de células 65 pueden utilizarse como células productoras de virus en el tejido linfóide. Las células que pueden utilizarse como células productoras de virus se exponen con mayor detalle en los Ejemplos siguientes.

Ejemplo 9

Dendrocitos autólogos o isogénicos o células de Langerhans

5 Las células productoras de virus de clase 4 se producen preferentemente introduciendo el ADN que codifica un virus atenuado en los dendrocitos (abundantes en los ganglios linfáticos y en el bazo) o en células de Langerhans (que se encuentran en la epidermis) que son derivados de la médula ósea y sumamente eficaces en la presentación de antígenos a linfocitos T CD4+ colaboradores, linfocitos T CD8+ citotóxicos y linfocitos T naturales. Grabbe *et al.* (1995) *Immunology Today* 16(3):117-121. Las células de Langerhans pueden migrar desde la piel a los órganos linfoides. Abbas *et al.*, anteriormente en la pág. 124. Además, Thomson *et al.* [1995] *Transplantation* 59:544-551) han demostrado que los dendrocitos cultivados *in vitro* están contenidos en los ganglios linfáticos de drenaje y en el bazo, donde persisten por lo menos dos meses. Los dendrocitos son, realmente, "células profesionales presentadoras del antígeno". Además, la proteína extraña presentada por los dendrocitos puede generar una respuesta de CTL (Rouse *et al.* [1994] *J. Virol* 68:5685-5689]), lo que presenta ventajas para la última eliminación completa de las células infectadas o productoras del antígeno vírico.

20 Pueden aislarse dendrocitos de la médula ósea, de la sangre periférica, de la sangre del cordón umbilical y de otros órganos utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Un procedimiento sencillo descrito para generar dendrocitos se ha descrito recientemente utilizando el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) más IL-4 (Romani *et al.* [1994] *J. Exp. Med* 180:83-93; Sallusto *et al.* [1994] *J. Exp. Med.* 179:1109-1118).

25 De este modo, una forma de realización preferida de la presente invención emplea dendrocitos para transportar virus atenuados de clase 4 a los órganos linfoides. Estas células pueden aislarse, transducirse con ADN que codifica un virus atenuado y reintroducirse en el hospedador. El ADN que codifica virus atenuado tal como el virus con integrasa defectuosa eliminada en 3' descrito anteriormente, puede introducirse en los dendrocitos por los procedimientos esbozados en los ejemplos 13 y 14.

Ejemplo 10

Dendrocitos isogénicos

30 Según la presente invención, los dendrocitos para isogénicos, por ejemplo de la sangre del cordón umbilical, pueden transducirse también para crear células productoras de virus. Esto permite el trasplante de células productoras 35 antigenicas en ausencia de injerto-contra-enfermedad del hospedador. Las células para isotrasplante se obtienen fácilmente mediante prácticas bien conocidas por un experto en la materia. El ADN que codifica el virus atenuado se introduce en las células para isotrasplante por los procedimientos descritos a continuación en los ejemplos 13 y 14.

Ejemplo 11

Fibroblastos

40 Pueden transducirse también fibroblastos con un virus atenuado de clase 4 de la presente invención para crear células productoras de virus. Es conocido en la técnica, que pueden introducirse fibroblastos para provocar respuestas 45 de los linfocitos T porque transportan y presentan de manera eficaz el antígeno a los órganos linfoides (Kunding *et al.* [1995] *Science* 268:1343-1347). Los fibroblastos se obtienen fácilmente mediante prácticas conocidas por un experto en la materia y se transducen por los procedimientos descritos a continuación en los ejemplos 13 y 14.

Ejemplo 12

Células para isotrasplante o xenotrasplante

50 Según la presente invención, las células transducidas transportan el ADN de clase 4 a los órganos linfoides y producen virus. El virus libre en el órgano linfoide estimula inmunocitos para la presentación del antígeno y la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, las células transducidas son reconocidas por el sistema inmunitario como células infectadas y se eliminan, independientemente de si las células son autólogas o para alotrasplante. La diferencia puede ser la velocidad de eliminación. En el caso de producción eficaz de virus y de la presentación del antígeno las células transducidas pueden provocar una respuesta inmunitaria suficiente en un periodo de tiempo más breve. Si la propia célula transducida es incapaz de actuar como APC primaria el virus producido puede funcionar como un antígeno libre, y las células infectadas pueden funcionar como APC secundaria. Grandes cantidades de células transducidas para isotrasplante o incluso xenotrasplante pueden producirse y pueden utilizarse alícuotas para inmunización genética de todos los individuos.

55 Resultará evidente para los expertos en la materia que además de las expuestas anteriormente, cualquier otra célula capaz de producir virus/citocina(s)/antígeno(s) tumoral(es) en los órganos linfoides pueden utilizarse también como células productoras de virus para introducir virus de clase 4 atenuados directamente en los órganos linfoides para conseguir las ventajas de la presente invención como se describe en la misma.

Ejemplo 13

Transducción in vitro y administración de células transducidas

- 5 Se introduce material genético en las células apropiadas para convertirlas en virus o células productoras de virus o virus/citocina. Se obtienen células apropiadas mediante cualquier variedad de procedimientos conocidos por un experto en la materia. Pueden obtenerse células del paciente que va a ser tratado, como fuente autóloga. La presentación de los antígenos junto con MHC y las moléculas coestimulantes produce una respuesta aumentada mediada por la célula. Pueden seleccionarse células de diferentes individuos o de diferentes especies para la transducción en un paciente no relacionado porque el virus de clase 4 se produce a partir de las células transducidas que pueden infectar las células hospedadoras del paciente que presentan a continuación el antígeno junto con la MHC del hospedador y moléculas coestimuladoras. Por consiguiente estas células infectadas para xenotrasplante pueden funcionar para transportar el ADN vírico al tejido linfóide.
- 10 15 La transferencia *in vitro* de ADN que codifica virus de clase 4 se puede realizar utilizando, por ejemplo, infección, electroporación, liposomas, virosomas, complejos ADN-polilisímero-adenovirus o polietilenimina. Estos procedimientos resultan bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los procedimientos para utilizar liposomas para administrar el material genético a células específicas se han descrito con detalle en el documento WO 92/06677 (Schreier *et al.* [1992]). Alternativamente, los virus (por ejemplo, vacunas o poxvirus) capaces de infección abortiva (más de un ciclo) se pueden utilizar para transducir de manera eficaz el ADN en la célula y producir virus de clase 4. Según la presente invención las células productoras de virus, tales como las células transducidas, pueden administrarse al paciente humano o animal por:
- 20 25 (a) Inyección intraesplénica. Resulta preferida porque da como resultado la mayor probabilidad de que las células transducidas alcancen los órganos linfoides.
- (b) Inyección directa en el sistema linfático.
- 30 (c) Resulta asimismo preferida la inyección directa en las amígdalas porque es un órgano linfóide accesible.
- (d) Inyección intravenosa. La dosis depende de la cantidad del virus producido por las células productoras de virus. La administración repetida de células productoras de virus puede utilizarse para aumentar la respuesta inmunitaria.
- 35 (e) Inyección intraperitoneal.
- (f) Inyección intradérmica.
- 40 (g) Inyección intramuscular.

45 En la práctica el número óptimo de células que han de inyectarse y la inyección repetida debe establecerse para cada paciente, basándose en la respuesta inmunitaria generada. Esta determinación puede ser realizada fácilmente por un experto en la materia con la ventaja de la presente descripción.

Ejemplo 14

Transducción in vivo

- 50 Según la presente invención, el ADN que codifica un virus atenuado de clase 4, con o sin antígeno tumoral asociado o genes de citocina, puede administrarse directamente a las células para la transducción y migración al sistema linfóide por:
- 55 (a) Inyección directa de ADN. Después de la inyección intramuscular, intraesplénica, intraamigdalar o intradérmica de la construcción del plásmido, el ADN es seleccionado por las células que se convierten en células productoras de virus o virus/citocina(s) en los órganos linfoides. D. Weiner (1995) *Aids Research & Human Retroviruses* 11(1):S136 han demostrado que el ADN inyectado por vía intramuscular se expresa y genera una respuesta inmunitaria. El ADN así incorporado por los dendrocitos presentes cerca del punto de inyección puede transportarse al órgano linfóide y expresarse en el mismo. La inyección directa de ADN según la presente invención se realiza preferentemente en los puntos cargados con dendrocitos, por ejemplo, las amígdalas o el bazo para conseguir la presentación óptima del antígeno.
- 60 (b) Los liposomas pueden utilizarse para administrar ADN a los dendrocitos. Son preferibles las inyecciones intradérmica, intraesplénica, intraamigdalar, intramuscular e intravenosa.
- 65 (c) La inyección intraesplénica directa de poxvirus de clase 4, que puede infectar células humanas de manera abortiva. El ADN puede administrarse *in vivo* directamente a las células presentadoras del antígeno por infección y las partículas de virus se producirán en los órganos linfoides.

- 5 (d) Los supositorios rectales o vaginales, portadores, por ejemplo, de ADN, liposomas o virosomas pueden ser un procedimiento particularmente ventajoso para la administración del ADN que codifica construcciones de clase 4 a las células que migran a los órganos linfoides. Además los supositorios evitan la necesidad de agujas estériles o facilidades médicas, y proporcionan terapias antivíricas de otro modo que faltan en los países en desarrollo. Véase, por ejemplo, Marlink *et al.* (1994) *Science* 265:1587-1590.

Ejemplo 15

10 *Inmunización genética para la prevención y el tratamiento de enfermedades*

15 La inmunización genética según la presente invención produce la inducción de una potente respuesta inmunitaria contra los antígenos producidos en los órganos linfoides. Por consiguiente, la inmunización genética según la presente invención es útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades como las infecciones víricas y el cáncer. Además, los virus atenuados, defectuosos para replicación y defectuosos para integración utilizados para la inmunización genética presentan muchas ventajas porque no pueden probar la infección, no pueden producir la expresión del oncogén o la destrucción del gen como resultado de la integración, y no influyen en las células responsables de la reproducción.

20 En el caso de una epidemia como de la gripe o del VIH, o para individuos con un alto riesgo de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama), la utilización de la inmunización genética como prevención es particularmente apropiada. En el caso de infecciones víricas la inmunización genética genera preferentemente inmunidad de larga duración y reactiva cruzada. Esto no es posible con los presentes vacunas experimentales porque las vacunas subunidad con frecuencia no presentan antígenos en el lugar correcto o la configuración correcta, y la probabilidad de producir linfocitos T con memoria reactivos en cruz es pequeña. Aunque las vacunas víricas vivas atenuadas han proporcionado protección cruzada, esta protección se generó solamente varios meses después de la inmunización.

25 La invención descrita en la presente memoria resuelve los problemas principales en el desarrollo de la vacuna al presentar antígenos en la configuración correcta en el lugar donde se genera la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, la respuesta inmunitaria es de larga duración y protectora cruzada. Además, ya que se produce un virus atenuado donde se concentran las células inmunitarias, la infección de células espectadoras da como resultado la presentación del 30 antígeno que conduce no solamente a la provocación de respuestas inmunitarias humorales y celulares sino también a la producción de inmunidad natural (por ejemplo, células destructoras naturales y macrófagos) y a la producción de factores solubles (por ejemplo, citocina, interferón, quimiocinas). Los linfocitos T con memoria, otras células que responden y factores solubles circulan continuamente en la sangre y alcanzan la piel y las mucosas, donde generan una rápida respuesta inmunitaria a los antígenos víricos o tumorales. Además, la inmunización genética contra el VIH-1 35 puede producir una inmunidad protectora cruzada a largo plazo. Asimismo, pueden utilizarse virus atenuados para la vacunación contra otras enfermedades producidas por retrovirus porque los retrovirus no pueden replicarse en ausencia de integración. Los retrovirus con integrasa defectuosa pueden inmunizar gatos contra *FN* o ganado bovino contra el VLB.

40 Las técnicas de inmunización genética de la presente invención pueden provocar también una respuesta inmunitaria en los casos en que el patógeno o la enfermedad están ya presentes y son especialmente beneficiosas para el tratamiento cuando la respuesta inmunitaria provocada por un patógeno u oncogén no es adecuada para eliminar las células infectadas o las células tumorales. En el caso de infección por HN el efecto terapéutico de la inmunización genética depende de cuán rápida se realice la respuesta después de la infección. Los que no evolucionan a largo plazo, 45 caracterizados por baja carga de virus y órganos linfoides intactos, puede eliminar el virus después de la inmunización genética. En cambio, los pacientes caracterizados por alta carga vírica y órganos linfoides destruidos no pueden desarrollar inmunidad terapéutica. Estos cuerpos de los pacientes deberían ser repoblados en primer lugar por células genéticamente resistentes a la infección, que pueden conseguirse introduciendo un gen antivírico en las células madre y/o periféricas (Lisziewicz *et al.* [1995] *J. Virol.* 69:206-212). Si el sistema inmunitario puede generar y eliminar 50 automáticamente los virus residuales.

55 Las técnicas de inmunización genética de la presente invención pueden utilizarse también como inmunoterapia para tumores. Las estrategias actuales están dedicadas a crear un medio rico en citocinas transfeciendo células tumorales con citocinas o convirtiendo las células tumorales en células presentadoras de antígeno transfecándolas con moléculas coestimuladoras. Kunding *et al.* ([1995] *Science* 268:1343-1346) sugirieron que pueden administrarse células tumorales a los órganos linfoides, que son ricos en citocina de manera natural, para provocar una respuesta inmunitaria protectora. La presente invención proporciona inmunización genética contra los tumores. Una aplicación es para el tratamiento o la prevención de los tumores generados por una infección vírica (directa o indirectamente). En estos 60 casos, los virus pueden modificarse genéticamente para convertirse en clase 4 y la inmunización genética realizarse según la presente invención.

65 La presente invención puede utilizarse también para la prevención y/o el tratamiento de tumores que no son un resultado de una infección vírica. Todas las células tumorales expresan genes, los productos requeridos para la transformación maligna. En muchos casos, los genes que producen tumor han sido ya identificados. Por ejemplo, MAGE-1 (antígeno-1 del melanoma) se expresa hasta en el cincuenta por ciento de los melanomas y por ciento de carcinomas de mama, pero no es detectable en tejidos normales. Este gen puede insertarse en un virus de clase 4 (por ejemplo, VIH) y transducirse en células en las que se genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno tumoral y el virus de clase 4. Otro procedimiento utilizado para generar una respuesta inmunitaria contra los antígenos tumorales consiste

en transducir en las células un plásmido que expresa solamente el antígeno tumoral; sin embargo, en este caso no puede generarse una respuesta inmunitaria secundaria (debido a la infección de células espectadoras) contra el antígeno tumoral. La respuesta de los linfocitos T citotóxicos generada por esta inmunización genética eliminará las células tumorales y las células con memoria serán responsables de la vigilancia inmunitaria contra este tumor.

5 Cualquier virus de clase 4 puede utilizarse según la presente invención para la inmunización genética antitumoral. Resulta preferido que el virus de clase 4 presente tropismo para infectar las células inmunitarias en los órganos linfoides para generar células presentadoras del antígeno secundarias. La generación de una respuesta inmunitaria contra varios antígenos tumorales presenta grandes ventajas en los casos en los que un tipo de tumor puede expresar 10 diferentes antígenos tumorales (por ejemplo, solamente el cincuenta por ciento del melanoma expresa MAGE-1).

Ejemplo 16

Inmunización genética contra HN

15 La siguiente es una descripción paso a paso de una forma de realización para realizar los procedimientos de la presente invención.

1. Preparación del ADN que codifica la integración de VIH-1 y SIV defectuosos

20 (a) Las eliminaciones en el gen de integrasa se introducen por mutagénesis aleatoria con el fin de truncar al azar la integrasa. La caracterización *in vitro* de los virus mutantes puede utilizarse para confirmar que la descendencia del virus es de clase 4 y puede expresión génica y presentación del antígeno tras la infección de las células diana. Se prefiere generar una eliminación “fuera del marco” en la parte central del gen 25 de integrasa. Las Figuras 2A-2B ilustran el genoma del VIH natural, las particularidades de la proteína integrasa y un ejemplo del gen de integrasa atenuado que genera un virus de clase 4. Específicamente, esta mutación produce una proteína de integrasa trucada que comienza en el extremo 5' del tipo natural y termina en el primer codón de terminación después de la eliminación. La proteína mutante puede ser, por ejemplo, de aproximadamente la mitad del tamaño de la integrasa natural.

30 (b) La eliminación dirigida dentro del gen de integrasa puede generarse por PCR (en presencia de una enzima resistente a la lectura). Puede utilizarse como plantilla ADN plásmido que codifica un provirus de VIH o VIS. Se diseñan cebadores para hibridar al gen de integrasa en el punto de la eliminación o eliminaciones deseada(s). La eliminación puede comenzar en 5' desde el punto activo de la integrasa y terminar en el extremo 3' de la integrasa. El producto de PCR generado es un ADN bicatenario, que está ligado para obtener 35 un plásmido circular con el gen de integrasa eliminado. El ADN se amplía por PCR o transformación en un microorganismo tal como *E. coli* o levadura. Utilizando esta estrategia, puede eliminarse el extremo 3' del gen de integrasa. Ésta es una estrategia preferida porque (a) los epítotos del extremo 5' de la integrasa se presentan en las células transducidas o infectadas (b) la destrucción de la parte central de la integrasa da como resultado la eliminación del punto activo de la proteína (maximizando la seguridad debido a la falta de integración) y (c) eliminando el extremo 3' de la molécula disminuye la fijación de la integrasa al ADN no integrado. Dado que esta interacción proteína-ADN inhibe la expresión génica, la eficacia máxima de la expresión del gen en las células infectadas se consigue por truncamiento de la proteína integrasa en el extremo 3'. El truncamiento similar de la integrasa se demostró ya (Cara *et al.* (1995) *Virology* 208:242-40 248), sin embargo, la mutación de Cara fue una mutación puntual que es menos segura para la inmunización genética de los seres humanos. Además, Cara y otros trabajos con virus negativos a integrasa han analizado 45 solamente la producción del virus en linfocitos y macrófagos, pero no han caracterizado las propiedades de presentación del antígeno de las células infectadas, que es un elemento clave para la inmunización genética.

*2. Caracterización *in vitro* de los virus de integración defectuosa y selección de virus de clase 4 para inmunización genética*

55 (a) *Caracterización de virus defectuosos de integrasa de clase 4.* En una forma de realización, se producen partículas de virus negativas a integrasa tras la transfección (procedimiento de CaPO₄) de las estirpes celulares 293, HeLa o HeLa-Tat. La cantidad de partículas víricas puede determinarse mediante p24 o, en el caso de VIS, el ensayo de captura del antígeno p27 (Immunotech). Estos virus se utilizan a continuación para la infección de células mononucleares primarias de la sangre periférica humana PBMC (PHA+IL-2), linfocitos T CD4⁺ primarios, macrófagos primarios y/o dendrocitos cultivados en condiciones óptimas para la infección por VIH/SIV. La producción y propagación del virus puede controlarse mediante el ensayo de captura del antígeno y por PCR. La presentación del antígeno puede determinarse mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T. Estos experimentos se diseñan para asegurar las condiciones óptimas para la replicación del virus. Los virus de clase 4 no crearán infección ni la replicación terminará después de varios ciclos. Preferentemente, los virus mutantes que infectan células de manera productiva en estas condiciones óptimas no se consideran ya para la inmunización genética. Puede también determinarse si estas células infectadas pueden presentar antígenos contra linfocitos T específicos para VIH-1 CD8⁺ y CD4⁺ y para linfocitos T naturales. Si el virus puede expresar genes en ausencia de integración en las células infectadas, activará células con memoria específica para VIH-1. Los dendrocitos infectados presentarán antígeno y activarán células naturales CD8⁺ y con memoria y también presentarán antígenos víricos para linfocitos T

CD4⁺. El virus con integración defectuosa óptima infectará linfocitos T CD4⁺, macrófagos y dendrocitos y expresara genes víricos en las células diana para la presentación del antígeno.

- 5 (b) *Transducción de dendrocitos humanos.* Los dendrocitos humanos pueden aislarse de la sangre periférica, de la médula ósea y de la sangre del cordón umbilical. Las células pueden cultivarse con GM-CSF e IL-4. El ADN que codifica el VIH y VIS negativos para la integrasa puede transducirse a continuación en estas células. Pueden aplicarse electroporación, infección, liposomas, virosomas y/o transferencias génicas mediadas por polietilenimina y establecer condiciones óptimas para la transducción utilizando técnicas convencionales. Tras la transducción, la producción del virus puede controlarse mediante el ensayo de captura del antígeno p24 y controlar el número de células productoras de virus por el ensayo de inmunofluorescencia. Como se describió anteriormente, puede ensayarse la presentación del antígeno a los linfocitos T con memoria y naturales. Resulta la activación fuerte de los linfocitos T naturales y con memoria por los dendrocitos transducidos.
- 10 (c) *Transducción de linfocitos.* Se aíslan linfocitos CD4⁺ primarios de donantes humanos normales, se activan con PHA y se cultivan con IL-2. El ADN del VIH negativo a integrasa se introduce a continuación (por ejemplo electroporación u otros métodos) y la producción del virus se controla por el ensayo de captura del antígeno p24. Este experimento puede utilizarse para asegurar más que los virus con integrasa defectuosa no pueden crear infección productiva. Pueden realizarse experimentos similares con VIS utilizando células de mono.
- 15 (d) *Transducción de fibroblastos y dendrocitos murinos.* El ADN del VIH-1 negativo a la integrasa puede transducirse en dendrocitos y fibroblastos de origen murino. La producción de virus se controla por el ensayo de captura del antígeno p24. Este experimento puede utilizarse para determinar si las células murinas pueden expresar un virus de clase 4 específico.
- 20 (e) *Evaluación de la respuesta inmunitaria en histocultivo de amígdala humana.* Pueden utilizarse cultivos de amígdala humana como modelo para estudiar la respuesta inmunitaria humana. Esto es beneficioso en la presente invención si los modelos de animales no simulan completamente la patología característica de la infección por VIH. Se desarrolló recientemente un procedimiento de cultivo tisular (Gluhakova *et al.* [1995] *Nature Medicine* 1:1320-1322) que apoya la replicación del VIH-1 según la presente invención. El ADN del VIH-1 negativo a la integrasa puede transducirse en dendrocitos autólogos aislados de la sangre periférica tal como se describió anteriormente. Las cantidades variables de estas células se microinyectan a continuación en los bloques de tejido de amígdala humana. Se controla la provocación de respuestas de CTL y anticuerpos. En experimentos posteriores, los cultivos de amígdala (inyectada con células dendríticas) pueden someterse a la prueba de provocación mediante infección con diferentes tipos de VIH y la inhibición de la replicación del virus medirse mediante el ensayo de captura del antígeno. La protección cruzada de diferencia subtipos se estudia fácilmente en este modelo debido a la generación de una respuesta inmunitaria antivírica potente en este sistema. Se realizan experimentos similares en cultivos de amígdalas aisladas de individuos infectados, preferentemente niños.

3. Experimentación *in vivo* (modelo murino) de inmunización genética

45 Si el experimento descrito en 2(d), anteriormente, demuestra la producción de virus por dendrocitos o fibroblastos murinos transducidos, pueden realizarse los experimentos siguientes en ratones. (Alternativamente, pueden utilizarse ratones transgénicos con CD4 humano en lugar de ratones normales. En este modelo, el VIH-1 no puede crear infección productiva, sin embargo, puede presentar la ventaja de que el virus mutante puede introducirse en inmunocitos espectadores).

50 Modelo murino: Pueden generarse proteínas de VIH-1 que expresan células tumorales (por ejemplo gp120) por transfección y selección *in vitro*. Estas células se inoculan a continuación en ratones que producen tumores. La inducción de la vigilancia inmunitaria mediante la serie de reacciones de MHC de clase I y clase II se realiza por inmunización genética y protegerá a los animales contra la prueba de provocación de tumor. Este modelo murino también se ensaya para la inmunización genética contra los tumores debido a que el VIH-1 defectuoso para la integración lleva parte del genoma vírico gp120 que, en este modelo, es un antígeno tumoral. Este modelo se diferencia de los modelos descritos anteriormente porque las células transducidas producen un virus libre que puede ser capturado por otras células (por ejemplo, por fagocitosis) en contraste con los que solo expresan un antígeno. Otros modelos tumorales pueden utilizarse también junto con los que expresan el antígeno tumoral correspondiente.

- 55 (a) para evaluar la eficacia de la inmunización genética, pueden inyectarse por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal y en el bazo del ratón de trasplante isogénico diferentes dosis (10 a 10⁷) de dendrocitos murinos cultivados con GM-CSF e IL-4 y transducidos con VIH-1 con integrasa defectuosa. Eso permite el examen de si la inmunización genética con dendrocitos transducidos provoca una respuesta de CTL CD8⁺ contra gp120 *in vivo* e *in vitro*. Se inoculan ratones con células tumorales que expresan gp120. El desarrollo de tumores se controla posteriormente durante, por ejemplo, hasta 60 días. La citotoxicidad específica de gp120 se mide también después de la reestipulación *in vitro* de esplenocitos según Zinkernagel *et al.* ([1985] *J. Exp. Med.* 162:2125). Este experimento puede utilizarse también para evaluar la función del punto de inyección en un sistema específico.

- (b) El experimento descrito en (a) puede repetirse en ratones con CD4 transgénico. Las células CD4 de estos ratones pueden infectarse con VIH, por consiguiente la comparación de la inmunización genética entre ratones transgénicos normales y con CD4 puede utilizarse para evaluar la función del antígeno secundario que presenta células en la generación de respuestas inmunitarias.
- (c) Pueden inyectarse fibroblastos murinos (por ejemplo estirpe celular de fibroblastoma) transducidos con VIH-1 con integrasa defectuosa como se describió anteriormente para determinar la eficacia de la respuesta inmunitaria de la inmunización genética con células presentadoras de antígeno "no profesionales" en un sistema específico.
- (d) Puede repetirse el experimento (a) en células receptoras isogénicas para evaluar si las células antólogas o singénicas son mejores para una inmunización genética específica. Dado que VIH no infecta células murinas, las células presentadoras del antígeno secundario no se generarán en ratones. Por consiguiente, el cebado cruzado con MHC de hospedador puede requerirse en ratones, pero no en monos o seres humanos. Alternativamente, puede procesarse el virus producido por las células presentadoras del antígeno profesional del receptor alogénico (incluso en ausencia de infección) que pueden también producir el rechazo del tumor y la respuesta de CTL a antígenos víricos.
- (k) La inyección directa (intravenosa, intraesplénica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal) de diferentes cantidades (1-40 µg) del ADN que codifica un VIH con integrasa defectuosa puede utilizarse en lugar de la inyección de las células transducidas por los procedimientos descritos anteriormente para evaluar la eficacia de la introducción *in vivo* del ADN y si este procedimiento producirá la transducción de células presentadoras del antígeno, la generación de respuestas de CTL y la eliminación de células tumorales en una forma de realización específica.
- (f) Diferentes cantidades (1-40 µg) de ADN que codifica un VIH-1 con integrasa defectuosa pueden encapsularse en liposomas y virosomas para inyección (intravenosa, intraesplénica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal) en un ratón u otro hospedador como se describió anteriormente. Estos procedimientos que ayudan a evaluar la eficacia de estos sistemas de administración de genes pueden transducir inmunocitos *in vivo*, y si la transducción *in vivo* produce una respuesta eficaz de CTL capaz de eliminar células tumorales que expresan gp120.
- (g) Cuando uno de los procedimientos anteriores produce el rechazo del tumor y la generación de una respuesta de CTL del virus producido, puede utilizarse fácilmente a continuación el modelo murino para ensayar los supositorios rectales y vaginales portadores del ADN del VIH con integrasa deficiente encapsulado en liposomas o virosomas.
- (h) Los virus de la vacuna con replicación defectuosa pueden infectar células murinas debido a su amplia gama de hospedador. Los dendrocitos pueden infectarse con virus de vacuna que expresa a gp120 que infecta de manera abortiva las células (en lugar de la transducción con ADN). Como las células infectadas pueden producir partículas de virus infecciosas (controladas *in vitro* por valoración en una estirpe celular sensible), estas células se utilizan para determinar la eficacia de la inmunización genética por los procedimientos descritos anteriormente.
- (i) Se presenta la vacuna con replicación alterada una vez (u otro pox para infectar dendrocitos murinos *in vitro* y producir partículas infecciosas, la infección *in vivo* en el bazo puede realizarse a continuación utilizando diferentes dosis víricas). Se controla la producción de la vacuna en los bazos de los animales sacrificados tras la infección *in vivo*. Los animales pueden someterse también a la prueba de provocación con células tumorales. El desarrollo del tumor y la actividad de CTL antitumoral se determinan posteriormente.

El virus de la leucemia de Moloney murino (VLM) puede infectar eficazmente células murinas y producir leucemia en el modelo murino. Puede construirse el VLM con integrasa defectuosa como se describió para VIH-1 y utilizarse para la inmunización genética en los procedimientos descritos anteriormente. La ventaja de este modelo es que los ratones son los hospedadores naturales del VLM (como son los humanos para el VIH o los de monos para el VIS) y la inhibición de la replicación del virus puede controlarse en lugar de la formación del tumor. Asimismo, puede utilizarse el virus de la inmunodeficiencia felina negativo para la integrasa en gatos como modelo animal. Sin embargo, para evaluar la actividad antivírica de la inmunización genética, los autores prefieren la utilización de primates no humanos porque los resultados pueden aplicarse más fácilmente a seres humanos.

4. Experimentación *in vivo* (modelo de primate no humano) de inmunización genética

Macacos infectados con VIH desarrollan SIDA en dos años y la evolución de la enfermedad es muy similar a la del VIH en seres humanos, utilizando este modelo animal, puede ensayarse la inmunización genética como prevención así como terapia. El VIS con integración defectuosa se expresa de manera eficaz con células de macaco (la expresión génica esta activada de manera activada de manera apropiada por tat) y el virus producido en los órganos linfoides puede infectar otros inmunocitos y por consiguiente generar células presentadoras del antígeno secundarias. Este es un excelente modelo para determinar la eficacia de la inmunización genética.

- 5 (a) Dendrocitos autólogos cultivados con GM-CSF e IL-4 pueden transducirse con VIS con integración defectuosa. Tras la inyección intraesplénica de diferentes cantidades de dendrocitos transducidos en animales naturales, los monos se someten a la prueba de provocación con dosis infecciosas de diferentes subtipos de VIS. Se determina la respuesta inmunitaria humoral y celular y la producción de citocina antes y después de la prueba de provocación. Tras la prueba de provocación, pueden analizarse las muestras de sangre periférica y ganglios linfáticos por RT-PCR para detectar la carga vírica. Este procedimiento determina la cantidad óptima de dendrocitos que necesita ser inyectada para conseguir inmunidad protectora y reactiva cruzada.
- 10 (b) Puede determinarse fácilmente el nivel de protección cruzada entre diferentes lentivirus para un sistema determinado, puede inmunizarse genéticamente animales con un VIH-1 con replicación integrasa defectuosa. Posteriormente, los animales inmunizados se someten a la prueba de provocación con VIS patógeno.
- 15 (c) La eficacia de una inmunización genética específica en monos infectados con VIS puede estudiarse de la manera siguiente. Los dendrocitos autólogos cultivados con GM-CSF e IL-4 pueden transducirse con VIS de integración defectuosa. Los animales infectados con VIS reciben inyecciones intraesplénicas de dendrocitos transducidos brevemente (1 semana a 6 meses) después de la prueba de provocación con VIS. Se determinan las respuestas inmunitarias humorales y celulares y la producción de citocinas antes y después de la inmunización genética. Después de la prueba de provocación, se analizan muestras de la sangre periférica y de los ganglios linfáticos por RT-PCR para controlar la carga vírica. Este procedimiento ayuda a evaluar la eficacia de una inmunización genética específica como inmunoterapia como la infección por VIS.
- 20

Ejemplo 17

25 *Clonación de VIS con integrasa defectuosa para la evaluación de la estrategia de inmunización genética en primates no humanos*

30 Utilizando los dos cebadores:

35 **FL5: 5'-CTA CTA TGG TAC CCC AAA GGT GTG CTC-3'** (SEC ID nº 1)
(2x stop)

y

40 **FL6: 5'-TGA ATT TCA AAA GAA GGG GAG-3',** (SEC ID nº 2)

45 la PCR prolongada generará el plásmido representado en la Figura 4 que contiene una eliminación en el gen de integrasa entre los nucleótidos 6115 y 6257. Los autores han incluido dos codones de terminación en el marco para asegurar la generación de la proteína integrasa truncada (dos garantiza seguridad). El plásmido precursor, p239SpSp5', puede obtenerse mediante el programa AIDS Research and Reference Reagent Program, División de SIDA, NIAID, NIH, del Dr. Donald Desrosiers. Este plásmido puede utilizarse como describe Ogden Bio-Services Corp., 685 Lofstrand Land, Rockville, MD 20850, "Special Characteristics", para generar VIS tanto linfótropo como macrofagótropo. Para inmunización genética, se prefiere el virus macrofagótropo debido a su tropismo más amplio: puede infectar tanto linfocitos como macrófagos. Pueden caracterizarse otros mutantes para obtener un fenotipo que puede limitar solamente ciclos de replicación en macrófagos.

50 Debe apreciarse que los ejemplos y las formas de realización de la presente memoria se proporcionan únicamente a título ilustrativo, y que podrán introducirse modificaciones o cambios a partir de los mismos por los expertos en la materia y están comprendidos dentro del espíritu y del ámbito de la presente solicitud y del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una construcción genética inmunógena que expresa un lentivirus incompetente para la replicación en un órgano linfoide del hospedador, para la preparación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmunitaria en el hospedador al lentivirus.
- 10 2. Utilización de una célula dendrítica transducida con una construcción genética inmunógena que expresa un lentivirus incompetente para la replicación en un órgano linfoide del hospedador destinada a la preparación de un medicamento para producir una respuesta inmunitaria en el hospedador al lentivirus.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el virus es defectuoso en integración.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el virus presenta un gen de integrasa con una mutación que comprende una inserción o delección de por lo menos tres pares de bases.
- 20 5. Utilización según la reivindicación 4, en la que el gen de integrasa está mutado en el sitio activo y en el sitio de fijación del ADN.
- 20 6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el virus presenta una mutación en el gen gag.
- 20 7. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el virus se selecciona de entre VIH-1, VIH-2, VIS y VIF.
- 25 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la construcción genética puede transducir una célula, o la célula se transduce, para expresar una citocina, para aumentar o dirigir la respuesta inmunitaria del hospedador.
- 25 9. Utilización según la reivindicación 8, en la que la citocina se selecciona de entre IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-16, TNF, GM-CSF, IFN y quimiocinas de RANTES y MIP1.
- 30 10. Utilización según la reivindicación 8 ó 9, en la que la expresión de la citocina estimula una respuesta inmunitaria de tipo Th1 o Th2, una respuesta de las células destructoras naturales, una respuesta de los linfocitos T citotóxicos o una respuesta de los linfocitos B.
- 35 11. Composición farmacéutica que comprende una célula dendrítica que ha sido transducida con una construcción genética inmunógena que comprende el ADN plásmido que expresa un virus lentivirus incompetente para replicación, para su utilización en un procedimiento de inmunización.
- 40 12. Composición según la reivindicación 11, en la que el virus es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
- 40 13. Composición según la reivindicación 11 ó 12, en la que el virus es tal como se define en la reivindicación 6 ó 7.
- 45 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que la célula se transduce para expresar una citocina tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

50

55

60

65

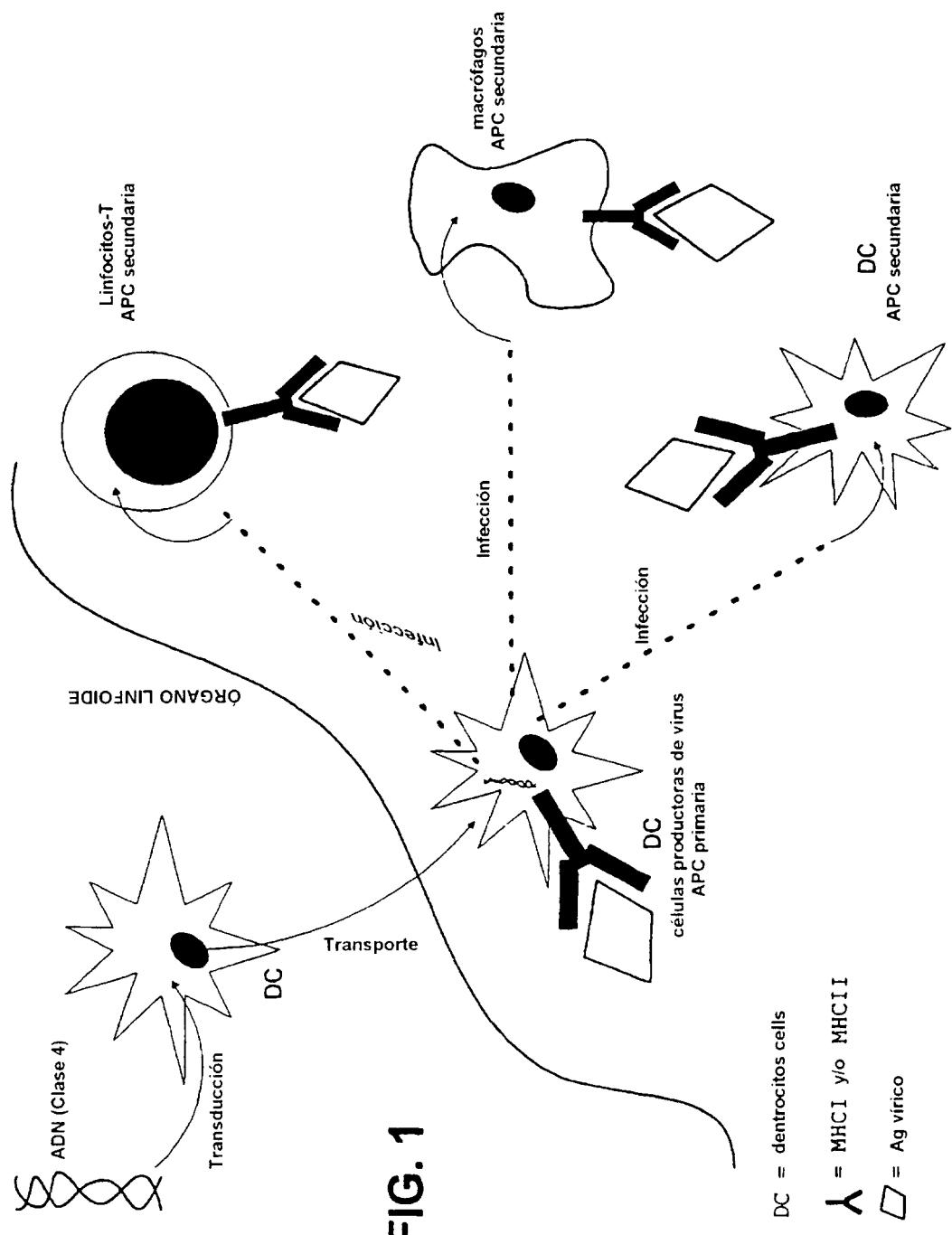


FIG. 1

FIG. 2A

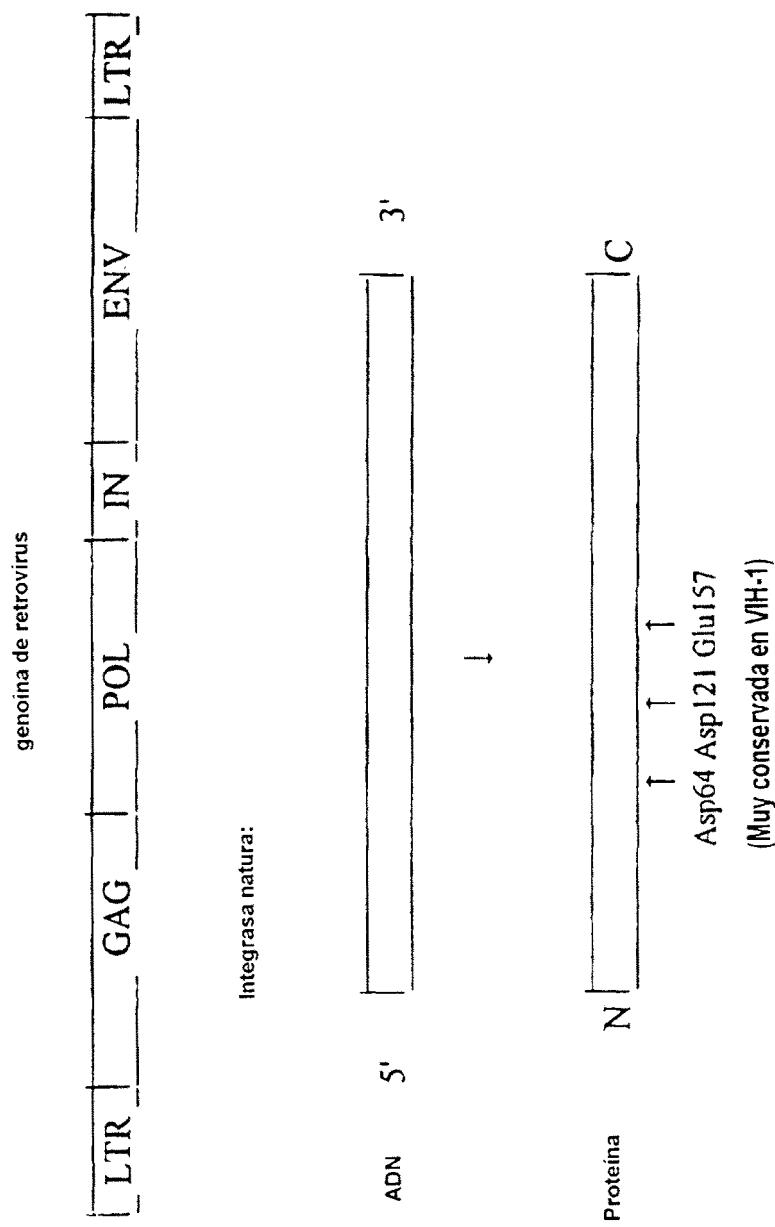


FIG. 2B

Mutante de integrasa:

Eliminación fuera del marco

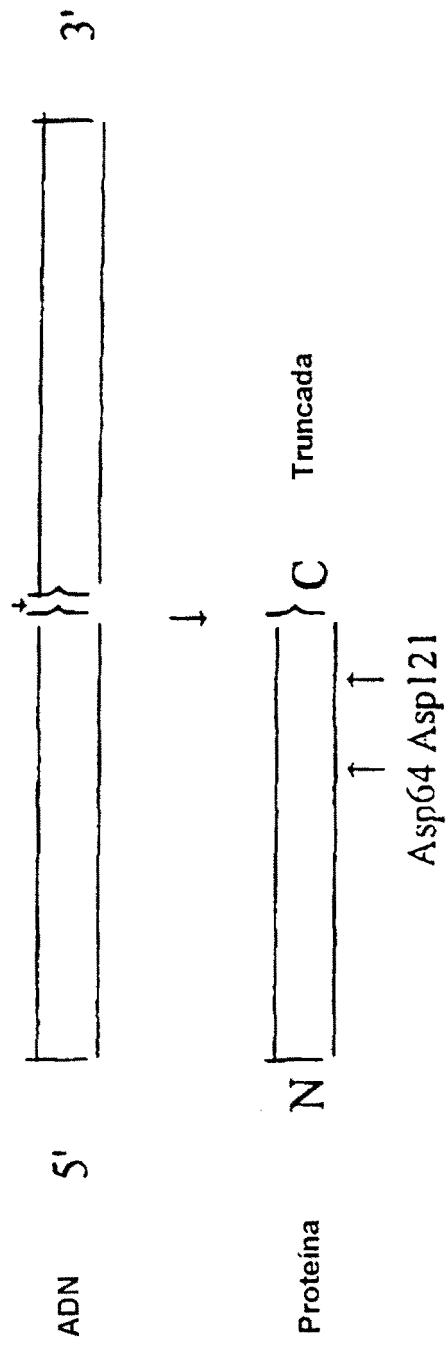


FIG. 3A

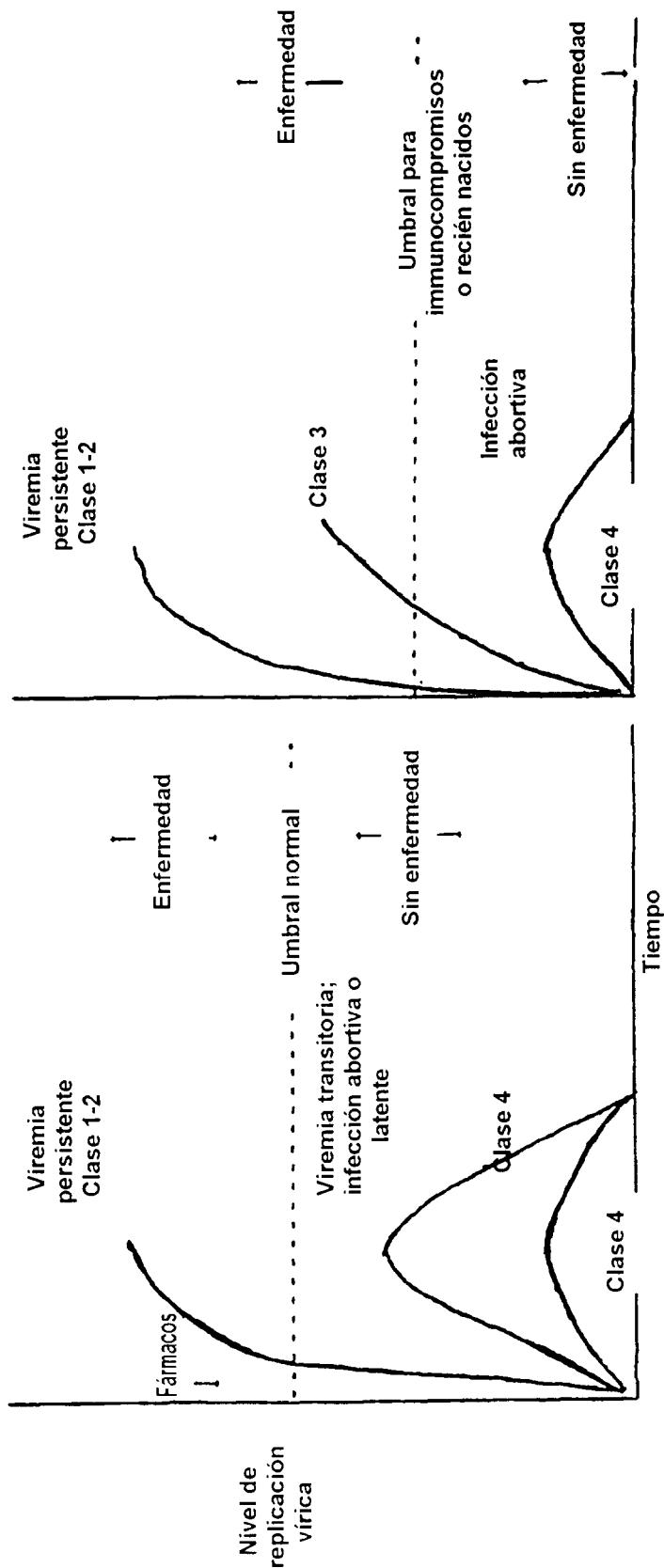


FIG. 3B

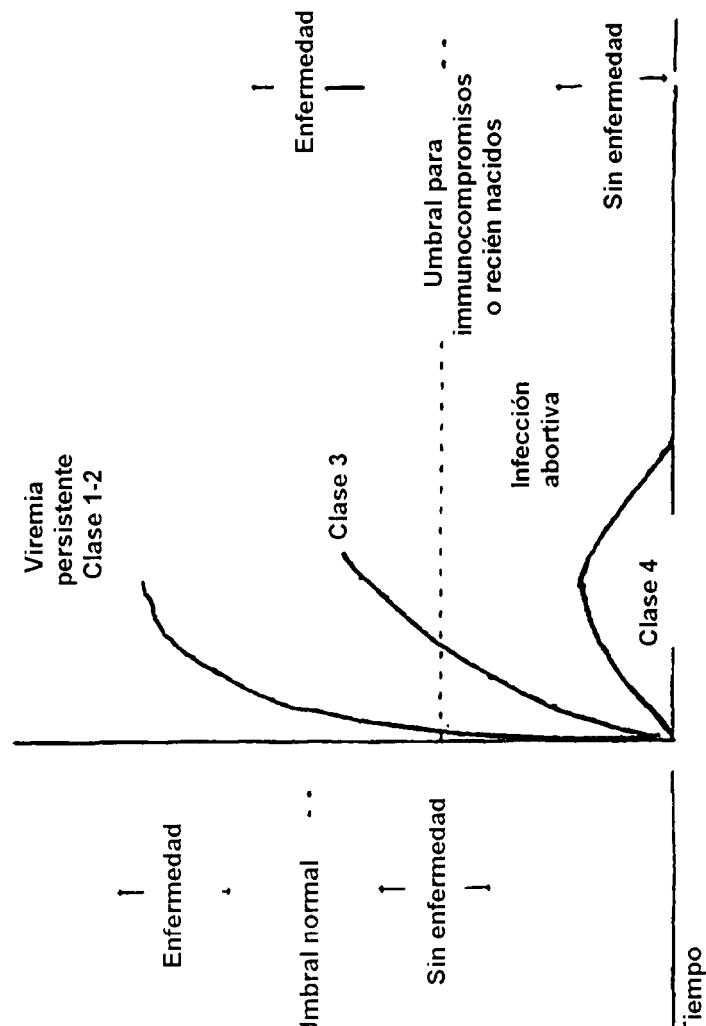
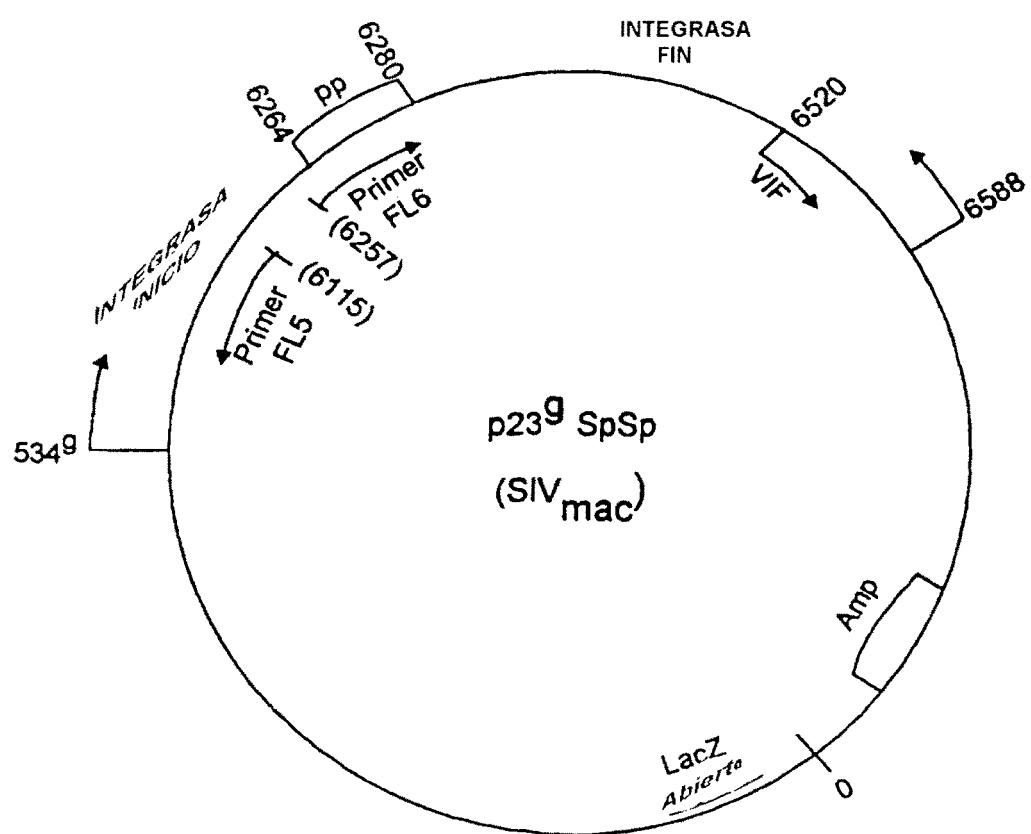


FIG. 4



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Lisziewicz, Julianna
Lori, Franco
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZACIÓN
GENÉTICA PROTECTORA Y TERAPÉUTICA
- 15 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- 20 (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
(A) REMITENTE: Saliwanchik & Saliwanchik
(B) CALLE: 2421 N.W. 41st. Street, Suite A-1
(C) CIUDAD: Gainesville
(D) ESTADO: Florida
(E) PAÍS: Estados Unidos
(F) CÓDIGO POSTAL: 32606
- 25 (v) LISTADO DESCIFRABLE POR ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.25
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
- 40 (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE
(A) NOMBRE: Saliwanchik, David R.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.794
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/ETIQUETA: RGT-100
- 45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
(A) TELÉFONO: (352) 375-8100
(B) TELEFAX: (352) 372-5800
- 50 55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) NÚMERO DE CADENAS: una
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 60 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. nº: 1:

ES 2 324 745 T3

CTACTATGGT ACCCAAAGG TGTGCTC

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 2:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 10 (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

TGAATTTAA AAGAAGGGGA G

21

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65