

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 743 677**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2009 E 15152408 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2865387**

(54) Título: **Cebado de una respuesta inmunitaria**

(30) Prioridad:

21.11.2008 DK 200801638

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

(73) Titular/es:

**KØBENHAVNS UNIVERSITET (UNIVERSITY OF COPENHAGEN) (100.0%)
Nørregade 10, Postboks 2177
1017 Copenhagen K, DK**

(72) Inventor/es:

**HOLST, PETER;
THOMSEN, ALLAN;
CHRISTENSEN, JAN y
GRUJIC, MIRJANA**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 743 677 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cebado de una respuesta inmunitaria

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una tecnología que utiliza un antígeno unido a una cadena invariante.

5 Antecedentes de la invención

La vacunación es la administración de un material antigénico (una vacuna) a un sujeto a fin de producir inmunidad a una enfermedad o dolencia. Cuando se usa para estimular una respuesta inmunitaria, el antígeno se conoce como un inmunógeno, y el proceso se conoce como inmunización. Las vacunaciones implican la administración de uno o más inmunógenos, que se pueden administrar en diversas formas.

10 La vacunación requiere el establecimiento de una respuesta inmunitaria sólida. La respuesta inmunitaria que se activa mediante infección o la vacunación depende de la interacción de varios tipos de células, tales como linfocitos T y B presentadores de antígenos, así como diversas moléculas diferentes, principalmente antígenos, moléculas MHC, receptores de linfocitos T y B y mucho más.

15 Vacunas tradicionales, o vacunas de primera generación, se basan en cepas patógenas muertas o atenuadas. Estas adolecen a menudo de infectividad reducida y son a menudo insuficientemente inmunógenas, dando como resultado una protección inadecuada de la vacunación.

El desarrollo de vacunas de segunda generación, o vacunas subunitarias, basadas en proteínas antigenicas individuales procedentes de organismos patógenos ha desvelado que los péptidos o carbohidratos puros tienden a ser inmunógenos débiles.

20 Las vacunas de ADN, o las vacunas de tercera generación, tienen la capacidad de inducir un intervalo más amplio de tipos de respuestas inmunitarias, pero mantienen la potencial desventaja de tener una baja inmunogenicidad en seres humanos.

Para todos los tipos de vacunas, los programas de vacunación se enfrentan a una necesidad sin cumplir para aumentar la potencia de la vacuna, para superar las limitaciones anteriormente citadas y proporcionar medios más económicos de estimular el sistema inmunitario durante la vacunación.

25 La divulgación se dirige a resolver el problema asociado con la baja inmunogenicidad de las vacunas proporcionando una solución para aumentar la potencia de las vacunas.

La divulgación se dirige a resolver el problema asociado con la baja inmunogenicidad de las vacunas proporcionando una solución para cavar una respuesta inmunitaria.

30 Se desvela en el presente documento el cebado del sistema inmunitario con una construcción de ácido nucleico que comprende la cadena invariante asociada a MHC de clase II/CD74 (denominada en el presente documento como una cadena invariante o li) o una variante de la misma y que codifica al menos una proteína antigenica o un fragmento de dicha proteína antigenica, seguido por una vacunación de refuerzo posterior para aumentar la potencia de dicha vacuna.

35 Las vacunas pueden dirigirse a un antígeno patógeno o a un antígeno canceroso.

Los datos presentados en el presente documento muestran que no es sencillo desarrollar regímenes de refuerzo del cebado usando construcciones de ácido nucleico que comprenden una cadena invariante o una variante de la misma.

40 Sorprendentemente, se desvela en el presente documento que li-KEY (que comprende restos de aminoácidos LRMK) y/o parte del dominio li-CLIP de la cadena invariante pueden alterarse sin reducir los efectos de dicho cebado inmunitario.

45 Se describen a continuación las referencias de la técnica anterior:

El documento WO 2007/062656 (Holst y col.) se dirige a desarrollar vacunas de ADN mejoradas para estimular la respuesta inmunitaria de manera que aumente la cinética de la respuesta, simultáneamente con la ampliación y la mejora de la respuesta. Holst y col., encontraron que la fusión de un antígeno con la cadena invariante potenció drásticamente las consiguientes respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ antivíricas mediante un mecanismo independiente de los linfocitos T CD4⁺.

Holmes y col. (J Clin Oncol. 2008, Jul 10;26(20):3426-33) describe el primer ensayo en fase I humano de una vacuna del péptido híbrido li-key, en la que li-key comprende la secuencia de cuatro aminoácidos LRMK, una porción central de la proteína de cadena invariante.

50 El hallazgo de Kallinteris y col. (Expert Opin. Biol. Ther. 2006, 6(12):1311,1321) se dirige también a utilizar el resto li-

key que comprende los aminoácidos LRMK para mejorar la potencia de la vacuna.

El documento US 2008/0095798 (Humphreys y col.) desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna contra un patógeno cebando en primer lugar el sistema inmunitario de un sujeto con una construcción del péptido híbrido li-Key que comprende los restos LRMK de dicho péptido li-key, y posteriormente administrar una vacuna contra un patógeno para reforzar la respuesta inmunitaria aumentada en la etapa de cebado.

5 El documento US 2004/058881 (Humphreys y col.) desvela un procedimiento para aumentar la potencia de la vacuna por lo cual, el sistema inmunitario de un sujeto se ceba en primer lugar con una construcción de un péptido híbrido li-Key antes de que el sujeto reciba posteriormente una vacuna para un patógeno de interés.

10 Holst y col (J. Immunol. 2008 180:3339-3346) desvelan que el enlace del antígeno a la cadena invariante asociada a MHC de Clase II mejora drásticamente la inmunidad mediada por célula inducida por vacunas de adenovirus.

Sumario de la invención

En un aspecto de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican

- a. al menos una variante de una cadena invariante unida operativamente a
- 15 b. al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido,

en la que al menos una variante de una cadena invariante comprende solo:

- (i) las secuencias adyacentes al extremo N de la región KEY de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2 pero sin la propia región KEY o
- (ii) una secuencia de al menos 15 aminoácidos adyacentes al extremo N de la región KEY de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2 pero sin la propia región KEY, en la que al menos 15 aminoácidos se encuentran dentro de los 30 restos de la región KEY.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vehículo de administración que comprende la construcción de ácido nucleico de la invención.

25 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una proteína químérica que comprende al menos una variante unida operativamente de una cadena invariante y al menos una proteína o péptido antigénico codificada por la construcción de ácido nucleico de la invención.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

30 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso en un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna que comprende las etapas de

- a. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico, estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- b. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa a) administrando una vacuna adecuada.

35 Se desvela el cebado del sistema inmunitario con una construcción de ácido nucleico que comprende al menos la cadena invariante asociada a MHC de clase II/CD74 (denominada en el presente documento como una cadena invariante o li) o una variante de la misma y que codifica al menos una proteína antigénica o un fragmento de dicha proteína antigénica, seguido por una vacunación de refuerzo posterior que aumenta la potencia de dicha vacuna.

Las vacunas pueden dirigirse a un antígeno patógeno o a un antígeno canceroso.

40 Se desvela que el dominio li-KEY (que comprende restos de aminoácidos LRMK) y/o parte del dominio li-CLIP puede sustituirse parcialmente u omitirse de la cadena invariante sin reducir los efectos de dicho cebado.

45 Se desvela que el problema de estimular adecuadamente la respuesta inmunitaria aumentado por la vacunación puede resolverse empleando un régimen de refuerzo del cebado de etapa doble, por lo cual, el sistema inmunitario se ceba en primer lugar con una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma seguido por una vacunación de refuerzo posterior que utiliza cualquier tipo de vacuna adecuada, de una manera que aumenta la cinética de la respuesta, simultáneamente con la ampliación y la mejora de la respuesta. En particular, un novedoso sistema para una estimulación dirigida, específica y rápida del sistema inmunitario se pone a disposición por la presente a fin de mejorar los regímenes de vacunación de todos los animales, tales como los seres humanos.

50 Se desvela en el presente documento que el cebado con una construcción de ácido nucleico basada en una cadena li aumenta significativamente la generación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno, linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos B tras refuerzo posterior con una vacuna.

Se desvela en el presente documento una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenético o un fragmento antigenético de dicha proteína o péptido, en la que dicha construcción de ácido nucleico es capaz de cebar el sistema inmunitario para potenciar la inmunización tras la administración de una vacuna posterior en un sujeto.

5 La presente divulgación en una realización proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenético o un fragmento antigenético de dicha proteína o péptido, en la que dicha construcción de ácido nucleico es capaz de cebar la inmunización mediante la administración de una vacuna posterior en un sujeto.

10 En una realización de la divulgación, la cadena invariante comprendida en la construcción de ácido nucleico de la divulgación puede alterarse a partir de su secuencia natural sin reducir el efecto de li.

Por tanto, en una realización de la divulgación, el dominio li-KEY que comprende los restos de aminoácidos LRMK ha sido alterado mediante delección o sustitución tal como mutación.

15 En otra realización de la divulgación, parte del dominio li-CLIP ha sido alterado mediante delección o sustitución tal como mutación. El dominio li-CLIP puede alterarse específicamente sustituyendo la metionina en la posición 91 y 99 por alanina; esto aumenta, de forma sorprendente, la presentación de MHCII.

En otra realización de la divulgación li puede alterarse específicamente mediante delección de los primeros 17 aminoácidos de li; esto aumenta, de forma sorprendente, la respuesta de memoria.

Resulta que cada una de estas alteraciones puede producirse por separado o en combinación.

20 En una realización de la divulgación, la cadena invariante comprendida en la construcción de ácido nucleico de la divulgación se altera a partir de su secuencia natural cuando se usa para cebar la respuesta inmunitaria de una vacuna dirigida a un virus, un microorganismo tal como una bacteria o un parásito.

En otra realización de la divulgación, la cadena invariante comprendida en la construcción de ácido nucleico de la divulgación puede alterarse o no a partir de su secuencia natural cuando se usa para cebar la respuesta inmunitaria de una vacuna contra el cáncer o una vacuna dirigida a una respuesta fisiológica anómala.

25 En otra realización de la divulgación, al menos una parte de la construcción de ácido nucleico usada para cebar la respuesta inmunitaria y la vacuna posterior usada para reforzar la respuesta inmunitaria son idénticas. Dicha al menos una parte idéntica del cebador y el refuerzo puede ser li o una variante de la misma, el péptido antigenético o parte del péptido antigenético, o un epítopo de linfocito T auxiliar ubicuo.

30 Es igualmente un objeto de la presente invención proporcionar un vehículo de administración que comprende la construcción de ácido nucleico como se detalla en el presente documento, en el que dicho vehículo de administración es un vehículo basado en ARN, un vehículo/vector basado en ADN, un vehículo basado en lípidos, un vehículo basado en un polímero o un vehículo de ADN o ARN derivado víricamente.

35 En una realización preferida, dicho vehículo de administración comprende la formación de liposomas, la formación de microesferas de polímero biodegradables, el revestimiento de la construcción de ácido nucleico sobre partículas de oro coloidales o la incorporación en un vector de ADN o ARN derivado víricamente.

En una realización más preferida de la divulgación, dicha construcción de ácido nucleico o dicho vehículo de administración se administra por medio de inyección con aguja, pistola génica, inyección por chorro, electroporación, ultrasonidos, o administración hidrodinámica.

40 Por tanto, es un aspecto de la divulgación proporcionar un medio para estimular una respuesta inmunitaria por una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenético o un fragmento antigenético de dicha proteína o péptido.

45 Un objeto adicional de la divulgación proporciona medios para estimular la diseminación intercelular de la construcción de ácido nucleico o las proteínas codificadas en cualquiera de estos o cualquier parte de cualquiera de estos.

Es un objeto más de la presente invención proporcionar una proteína químérica como la codificada por la construcción de ácido nucleico descrita en el presente documento.

Es además un aspecto de la divulgación proporcionar un anticuerpo que reconozca la proteína químérica codificada por la construcción de ácido nucleico descrita en el presente documento.

50 Es un aspecto de la divulgación proporcionar un procedimiento para mejorar la potencia de una vacuna que comprende administrar la construcción de ácido nucleico como se detalla en el presente documento.

Especialmente relevante para la divulgación es una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenólico o un fragmento antigenólico de dicha proteína o péptido que es adecuado para cebar una respuesta inmunitaria.

- 5 Es además un aspecto de la divulgación proporcionar un kit en partes, comprendiendo dicho kit una construcción de ácido nucleico que se describe en el presente documento junto con un instrumento médico u otros medios de administrar dicha construcción de ácido nucleico, y/o una vacuna adecuada, y además, instrucciones de cómo usar el kit en partes.

10 Resulta que la divulgación proporciona medios para potenciar una respuesta inmunitaria en un animal, administrando al animal una construcción de ácido nucleico como se detalla en el presente documento a continuación.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Cebado de ADN con una cadena li basada en una vacuna de ADN puro.

Figura 2: Localización de los dominios y las mutaciones ensayadas en la secuencia li.

15 **Figura 3:** li aumenta drásticamente la presentación en la superficie celular del epítopo derivado de SIINFEKL/H-2kb OVA.

Figura 4: li trabaja solo en cis.

Figura 5: Las delecciones y sustituciones en el extremo N no afectan la capacidad estimuladora de li.

Figura 6: Las delecciones y sustituciones en el extremo C no afectan la capacidad estimuladora de li.

20 **Figura 7:** Solo una delección en el extremo N y el extremo C reduce la capacidad estimuladora de li.

Figura 8: Respuesta a la dosis de las vacunas Ad-liGP y Ad-GP.

Figura 9: Comparación de Ad-GP, Ad-liGP y Ad-liCLIPGP para la presentación de MHC de clase II.

Figura 10: Comparación de Ad-GP, Ad-liGP, Ad-GPLamp-1 y Ad-liΔ17GP en un estudio de curso temporal *in vivo*.

25 **Figura 11:** Comparación de respuestas de Ad-GP, Ad-liGP, Ad-liΔ17GP, Ad-liKEYGP, Ad-liCLIPGP, Ad-li1-117GP y Ad-li1-199GP *in vivo*.

Figura 12: Ad-GP es capaz de cebar un refuerzo de Ad-liGP posterior.

Figura 13: Ad-liGP no es capaz de cebar un refuerzo de Ad-GP o Ad-liGP posterior.

Figura 14: Respuesta a la dosis de vacunas de Ad-GP y Adli-Gp.

Figura 15: El receptor de manosa acoplado a una variante de una cadena invariante que comprende los restos 50 a 215 (li50-215), acoplado además a una proteína de fibra adenovírica.

Definiciones

Adenovirus: Un grupo de virus que contiene ADN bicatenario. Los adenovirus pueden modificarse genéticamente haciéndolos incompetentes para la replicación o incompetentes condicionalmente para la replicación. En esta forma, como construcciones adenovíricas o adenovectores, se pueden usar como vehículos de administración génica para la vacunación o la terapia génica.

35 **Proteína de fibra adenovírica:** una proteína de fibra de cualquier serotipo de adenovirus. Se conoce también como fibra adenovírica knob o fibra adenovírica knob con inserciones knob heterólogas.

Adyuvante: Cualquier sustancia cuya premezcla con un determinante /antígeno / construcción de ácido nucleico inmunogénico administrado aumenta o modifica de otra forma la respuesta inmunitaria a dicho determinante.

40 **Aminoácido:** Cualquier ácido carboxílico sintético de amino de origen sintético o natural, incluyendo cualquier aminoácido que se produce en péptidos y polipéptidos incluyendo proteínas y enzimas sintetizadas *in vivo* incluyendo por tanto modificaciones de los aminoácidos. El término aminoácidos se utiliza en el presente documento de forma sinónima con la expresión "resto de aminoácido), que se entiende que abarca aminoácidos como se ha indicado que se han hecho reaccionar con al menos una especie diferente, tal como 2, por ejemplo 3, tal como más de 3 especies diferentes. El término genérico aminoácido comprende aminoácidos naturales y no naturales cualquiera de los cuales puede estar en la forma isomérica "D" o "L". Aminoácido puede abreviarse 'aa'.

45 **Anticuerpo:** Moléculas de inmunoglobulina y porciones activas de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos son por ejemplo moléculas de inmunoglobulina intactas o fragmentos de las mismas que retienen la actividad inmunológica.

50 **Antígeno:** Cualquier sustancia que se puede unir a un receptor inmunitario clonalmente distribuido (receptor de linfocitos T o linfocitos B). Usualmente un péptido, polipéptido o un polipéptido multimérico. Los antígenos son preferentemente capaces de estimular una respuesta inmunitaria.

55 **Refuerzo:** Reforzar mediante una inyección de refuerzo es administrar una o más dosis adicionales de un agente inmunizante, tal como una vacuna, administrada un lapso de tiempo después de la dosis inicial de una sustancia utilizada para cebar el sistema inmunitario, para sostener o potenciar la respuesta inmunitaria estimulada por la dosis previa del mismo (homólogo) u otro (heterólogo) agente inmunizante.

60 **Transportador:** Entidad o compuesto al cual se acoplan los antígenos para ayudar en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Proteína químérica: Una proteína diseñada mediante ingeniería genética que está codificada por una secuencia de nucleótidos preparada mediante corte y empalme de dos o más genes completos o parciales o una serie de ácidos nucleicos no aleatorios.

Complemento: Una serie compleja de proteínas en sangre cuya acción "complementa" el trabajo de los

- anticuerpos. El complemento destruye las bacterias, produce inflamación, y regula las reacciones inmunitarias.
- Citoquina:** moduladora del crecimiento o la diferenciación, usada de forma no determinativa en el presente documento, y no debe limitarse a la interpretación de la presente invención y las reivindicaciones. Además de las citoquinas, pueden emplearse moléculas de adhesión o accesorias, o cualquier combinación de las mismas solas o en combinación con las citoquinas.
- LTC:** Linfocitos T citotóxicos. Un subgrupo de linfocitos T que expresan CD8 junto con el receptor de linfocitos T y por tanto, son capaces de responder a los antígenos presentados por moléculas de clase I.
- Vehículo de administración:** Una entidad por la cual, una secuencia de nucleótidos o polipéptido o ambos se puede transportar desde al menos un medio a otro.
- Fragmento:** se usa para indicar una parte de longitud no completa de un ácido nucleico o polipéptido. Por tanto, un fragmento es por sí mismo también un ácido nucleico o polipéptido, respectivamente.
- Refuerzo heterólogo o refuerzo del cebado:** en el que la sustancia usada para reforzar el sistema inmunitario es diferente de la sustancia previamente usada para cebar una respuesta inmunitaria.
- Refuerzo homólogo o refuerzo del cebado:** en el que la sustancia usada para reforzar el sistema inmunitario es la misma que la previamente usada para cebar la respuesta inmunitaria.
- Individuo:** Cualquier especie o subespecie de pájaro, mamífero, pez, anfibio, o reptil, incluyendo seres humanos.
- Cadena invariante:** una glicoproteína de la proteína de membrana integral que se asocia y estabiliza las moléculas MHC II en el retículo endoplásmico y los compartimentos celulares posteriores. Aquí, la expresión cadena invariante cubre todos los genes y proteínas homólogos de longitud completa o fragmentados de origen natural o generados artificialmente de una determinada similitud con la cadena invariante humana. La cadena invariante es la de forma abreviada en el presente documento.
- Aislado:** usado junto con los ácidos nucleicos, polipéptidos, y anticuerpos desvelados en el presente documento 'aislado' se refiere a estos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural, normalmente celular. Los ácidos nucleicos, polipéptidos, y anticuerpos de la invención están preferentemente aislados, y las vacunas y otras composiciones de la invención comprenden preferentemente ácidos nucleicos aislados, polipéptidos o anticuerpos aislados.
- MHC:** Complejo de histocompatibilidad mayor, existe dos principales subclases de MHC, Clase I y Clase II.
- ADN puro:** El ADN no se asocia con histonas; ADN a menudo hipometilado y rico en CpG. El ADN puro puede ser circular o lineal, por ejemplo, un plásmido circular.
- Ácido nucleico:** Una cadena o secuencia de nucleótidos que transporta información genética. Con respecto a la presente invención, el ácido nucleico puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) o cualquiera del grupo que consiste en ácido ribonucleico (ARN), Ácido nucleico bloqueado (ANB), Ácido nucleico peptídico (ANP), Ácido nucleico intercalante (ANI), Ácido nucleico intercalante trazado (ANIT), Ácidos hexitol nucleicos (AHN), Ácido arabinonucleico (AAN), Ácidos ciclohexano nucleicos (ACN), Ácido ciclohexenil nucleico (ACeN), Ácido glicerol nucleico (AGN), Ácido treosil nucleico (ATN), Gap-meros, Mix-meros y Morfolinos.
- Construcción de ácido nucleico:** Un ácido nucleico diseñado mediante ingeniería genética. Comprendiendo normalmente diversos elementos tales como genes o fragmentos de los mismos, promotores, potenciadores, terminadores, colas poliA, enlazadores, polienlazadores, enlazadores operativos, sitios de múltiple clonación (SMC), marcadores, codones de detención, otros elementos reguladores, sitios de entrada a ribosomas internos (IRES) u otros.
- Enlazador operativo:** Una secuencia de restos de nucleótidos o aminoácidos que unen conjuntamente dos partes de una construcción de ácido nucleico o polipéptido (químérico) de manera que asegure el procesamiento biológico del ácido nucleico o polipéptido.
- Patógeno:** un agente causante específico de la enfermedad, especialmente un agente biológico tal como un virus, bacteria, prion o parásito que puede producir una enfermedad en su hospedador, denominado también un agente infeccioso.
- Péptido:** Pluralidad de restos de aminoácidos unidos covalentemente que definen una secuencia y unidos mediante enlaces amida. El término se usa de forma análoga con oligopéptido y polipéptido. Los aminoácidos naturales y/o no naturales pueden unirse mediante enlaces peptídicos o mediante enlaces no peptídicos. El término péptido abarca también modificaciones posteriores a la traducción introducidas mediante reacciones químicas o catalizadas con enzimas, como se conoce en la técnica. El término puede referirse a una variante o fragmento de un polipéptido.
- Transportadores farmacéuticos:** denominados también excipientes, o estabilizantes que no son tóxicos para la célula o el individuo que se está exponiendo a los anteriores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el transportador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de transportadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholos azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.
- Pluralidad:** Al menos dos.
- Cebado:** Cebado inicial del sistema inmunitario con, por ejemplo, ADN para centrar la respuesta inmunitaria sobre el inmunógeno requerido.
- Refuerzo del cebado:** Cebado inicial del sistema inmunitario con, por ejemplo, ADN para centrar la respuesta

inmunitaria sobre el inmunógeno requerido, y posterior refuerzo de la respuesta inmunitaria con una vacuna, que conduce a un aumento en la respuesta inmunitaria inducida por dicha vacuna.

Promotor: Un sitio de unión en una cadena de ADN al cual se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción del ARN mensajero por uno o más genes casi estructurales.

5 **Péptido de señalización:** Una secuencia corta de aminoácidos que determina la localización eventual de una proteína en la célula, denominado también péptido clasificador.

10 **Vacuna adecuada:** Cualquier vacuna para su uso de acuerdo con la divulgación, capaz de reforzar la respuesta inmunitaria estimulada por el cebado inicial, caracterizada por que al menos una parte de la construcción de ácido nucleico usada para cebar la respuesta inmunitaria y la vacuna posterior usada para reforzar la respuesta inmunitaria son idénticas. Dicha al menos una parte idéntica del cebador y el refuerzo puede ser lI o una variante de la misma, el péptido antigenico o parte del péptido antigenico, o un epítopo de linfocito T auxiliar ubicuo.

15 **Tensioactivo:** Un agente tensioactivo capaz de reducir la tensión superficial de un líquido en el que se disuelve. Un tensioactivo es un compuesto que contiene un grupo polar que es hidrófilo y un grupo no polar que es hidrófobo y compuesto a menudo por una cadena grasa.

20 **Vacuna:** Una sustancia o composición capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal: Denominada también una composición inmunógena en el presente texto. Una respuesta inmunitaria que es una respuesta inmunitaria (humoral/anticuerpo y/o celular) que induce memoria en un organismo, que da como resultado que el agente infeccioso reciba una respuesta secundaria más bien que una primaria, reduciendo por tanto su impacto en el organismo hospedador. Una vacuna de la divulgación puede administrarse como un medicamento profiláctico y/o un medicamento terapéutico. La composición puede comprender uno o más de los siguientes: antígeno(s), construcciones de ácidos nucleicos que comprende uno o más antígenos unidos operativamente a lI, transportadores, adyuvantes y transportadores farmacéuticos.

25 **Variante:** una 'variante' de un ácido nucleico o polipéptido de referencia dado se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que presenta un determinado grado de homología/identidad de la secuencia con dicho ácido nucleico o polipéptido de referencia, pero no es idéntico a dicho ácido nucleico o polipéptido de referencia.

Dominio, región y motivo se pueden utilizar de forma indistinta en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican

30 a. al menos una variante de una cadena invariante unida operativamente a

b. al menos una proteína o péptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteína o péptido,

en la que al menos una variante de una cadena invariante comprende solo:

(iii) las secuencias adyacentes al extremo N de la región KEY de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2 pero sin la propia región KEY o

(iv) una secuencia de al menos 15 aminoácidos adyacentes al extremo N de la región KEY de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2 pero sin la propia región KEY, en la que al menos 15 aminoácidos se encuentran dentro de los 30 restos de la región KEY.

La respuesta inmunitaria

40 Las vacunas se pueden usar profilácticamente: se administran antes de que se produzca la infección actual; o terapéuticamente: cuando estimulan o aceleran una respuesta inmunitaria a un patógeno ya en el cuerpo. Ambos procedimientos de vacunación requieren el establecimiento de una respuesta inmunitaria sólida. La respuesta inmunitaria que se activa mediante infección o la vacunación depende de la interacción de varios tipos de células, tales como linfocitos T y B presentadores de antígenos, así como diversas moléculas diferentes, principalmente antígenos, moléculas MHC, receptores de linfocitos T y B y mucho más.

45 Los antígenos son fragmentos peptídicos presentados sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos por moléculas MHC. Los antígenos pueden ser de origen extraño, es decir, de origen patógeno, o citoblastos del propio organismo, habitualmente denominados antígenos propios o autoantígenos. Las moléculas MHC son representativas de una familia de genes polimorfos codificada por una región cromosómica específica conocida como el "complejo de histocompatibilidad mayor", por lo tanto MHC. Existen dos clases de moléculas MHC, MHC de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II).

50 Los linfocitos T auxiliares se estimulan por antígenos presentados por moléculas MHC de clase II (MHC-II) que residen sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Las moléculas MHC-II se sintetizan en el retículo endoplásmico. Durante la síntesis, combinan con la cadena invariante (lI) de una manera que evita que se carguen las moléculas MHC-II con antígenos propios o autoantígenos. La molécula MHC-II es, según las secuencias de señalización en la cadena transportada a la superficie de la célula en un compartimento celular específico, como el compartimento madura mediante el procesamiento de sus contenidos, evoluciona desde un lisosoma, hasta un endosoma tardío (tras la fusión con vesículas endocíticas) a un compartimento MHC de clase II (MIIC). La vesícula endocítica contiene un antígeno extraño, es decir, fragmentos de péptidos bacterianos escindidos proteolíticamente. Estos fragmentos se preparan mediante su degradación para cargarse en la molécula MHC-II. La molécula MHC-II se

libera por la cadena invariante en un proceso en dos partes cuando la cadena invariante se degrada proteolíticamente en primer lugar dejando solo un péptido denominado CLIP en el dominio de unión a MHC-II, en segundo lugar mediante la eliminación de CLIP por una molécula HLA-DM. La molécula MHC-II es a continuación libre de unirse a los antígenos extraños y presenta estos en la superficie celular tras la fusión de la vesícula MIIC con la membrana plasmática. Esto 5 inicia la respuesta inmunitaria humoral ya que el antígeno presentado estimula la activación de un linfocito T auxiliar que a su vez, por diversos medios activa un linfocito B, que se diferencia en última instancia en una célula secretora de anticuerpos.

La respuesta inmunitaria celular se inicia cuando el receptor de linfocitos T de los linfocitos T citotóxicos reconoce la 10 unión del antígeno a la molécula MHC de clase I en una célula presentadora de antígenos. Las moléculas MHC-I no se asocian con una molécula de una funcionalidad similar a la cadena invariante que se asocia con MHC-II. El procesamiento de MHC-I en una molécula presentadora de antígenos difiere además del de las moléculas MHC-II en que la molécula MHC-I se carga con el antígeno ya en el retículo endoplásmico. Los antígenos presentados por la 15 molécula MHC-I son normalmente fragmentos peptídicos escindidos por el proteosoma de las proteínas que se han sintetizado por la propia célula presentadora de antígenos. Estas proteínas pueden ser proteínas anómalas codificadas en el ADN de las propias células o proteínas derivadas de virus u otros patógenos que han infectado la célula y parasitan su maquinaria de síntesis de proteínas. El sistema proteolítico relacionado con MHC de clase I está presente en virtualmente todas las células.

Las funciones de los dos tipos de linfocitos T son significativamente diferentes, como se implica por sus nombres. Los 20 linfocitos T citotóxicos erradican los patógenos intracelulares y los tumores mediante la lisis directa de las células secretando citoquinas tales como interferón-γ. El linfocito T citotóxico predominante es un linfocito T CD8⁺, que es también específico de antígeno. Los linfocitos T auxiliares pueden lisar también células, pero su función primaria es secretar citoquinas que promueven las actividades de los linfocitos B (células productoras de anticuerpos) y otros linfocitos T y por tanto, potencian ampliamente la respuesta inmunitaria a antígenos extraños, incluyendo los 25 mecanismos de respuesta mediados por anticuerpos y mediados por linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T CD4⁺ son el fenotipo principal de linfocitos T auxiliares en la respuesta inmunitaria.

Construcción de ácido nucleico

Un aspecto de la divulgación se refiere a construcciones de ácido nucleico tales como construcciones de ADN puro que comprenden secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenérico o un fragmento antigenérico de dicha proteína o péptido, en definitiva, un antígeno. 30

En una realización, La divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenérico o un fragmento antigenérico de dicha proteína o péptido, en el que dicha cadena invariante o variante de la misma no comprende los restos de los aminoácidos LRMK de la región KEY.

35 En otra realización de la divulgación, La divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenérico o un fragmento antigenérico de dicha proteína o péptido, en el que dicha cadena invariante o variante de la misma comprende una variante de la región CLIP.

40 En otra realización de la divulgación, La divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenérico o un fragmento antigenérico de dicha proteína o péptido, en el que dicha cadena invariante o variante de la misma no comprende los primeros 17 aminoácidos.

45 En otra realización más de la divulgación, La divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias que codifican al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a al menos una proteína o péptido antigenérico o un fragmento antigenérico de dicha proteína o péptido, en el que dicha construcción de ácido nucleico se usa para cebar una vacuna contra el cáncer.

Por construcción de ácido nucleico se entiende un ácido nucleico diseñado mediante ingeniería genética. La 50 construcción de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico no replicante y lineal, un vector de expresión circular o un plásmido que se replica de manera autónoma. Una construcción de ácido nucleico puede comprender algunos elementos tales como, aunque no de forma limitativa genes o fragmentos de los mismos, promotores, potenciadores, terminadores, colas poliA, enlazadores, polienlazadores, enlazadores operativos, sitios de múltiple clonación (SMC), marcadores, codones de detención, sitios internos de entrada a ribosomas (IRES) y secuencias hospedadoras homólogas para la integración u otros elementos definidos. Debe entenderse que la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender todo o un subconjunto de cualquier combinación de los 55 elementos anteriormente mencionados.

Los procedimientos para diseñar construcciones de ácidos nucleicos mediante ingeniería genética son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 2^a Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Además, las construcciones de ácido nucleico de acuerdo

con la presente invención pueden sintetizarse sin molde, y pueden obtenerse de diversos suministradores comerciales (por ejemplo, Genscript Corporation).

Los restos de ácidos nucleicos que comprenden la construcción de ácido nucleico pueden, en una realización, estar modificados. Dicha modificación se puede seleccionar entre el grupo que consiste en: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, ribosilación, sulfurización y otras.

La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede, en una realización, estar compuesta de ADN. En otra realización, La construcción de ácido nucleico puede estar compuesta de un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en ácido desoxirribonucleico (ADN), Ácido ribonucleico (ARN), Ácido nucleico bloqueado (ANB), Ácido nucleico peptídico (ANP), Ácido nucleico intercalante (ANI), Ácido nucleico intercalante trazado (ANIT), Ácidos hexitol nucleicos (AHN), Acido arabinonucleico (AAN), Ácidos ciclohexano nucleicos (ACN), Ácido ciclohexenil nucleico (ACeN), Ácido glicerol nucleico (AGN), Ácido treosil nucleico (ATN), Gap-meros, Mix-meros, Morfolinos, o una combinación de los mismos.

Como se ha analizado anteriormente, las moléculas MHCII se asocian con una cadena invariante durante el procesamiento, hasta que la cadena invariante asociada se degrada para permitir la carga de los péptidos antigenicos extraños sobre las moléculas MHCII. Cuando se aplica una construcción de una proteína externa que comprende una *cadena invariante - enlazador - epítopo*, en el que la cadena invariante comprende la región KEY (que comprende los restos de aminoácidos LRMK), dicha construcción de proteína interactuará con la molécula MHCII - que contiene un antígeno - en un punto cuando dicha molécula MHCII se localiza en la superficie extracelular de la célula. Por lo tanto, el efecto es externo y depende de la capacidad del resto KEY de la cadena invariante de la construcción de proteína que comprende los restos de los aminoácidos LRMK) que compite por la carga en las moléculas MHCII. En otras palabras, el antígeno ya cargado sobre la molécula MHCII durante el procesamiento intracelular debe 'eliminararse por tipación' o retirarse de la molécula MHCII sobre la superficie celular y sustituirse por la construcción de proteína que comprende la *cadena invariante - enlazador - epítopo*. Esto proporciona un efecto '1:1' que no se puede amplificar, y es invariable dependiente de la presencia de los restos de los aminoácidos LRMK de la cadena invariante.

La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación se refiere a aplicar una construcción de ácido nucleico 'interna' que codifica la cadena invariante o una variante de la misma y que codifica también un péptido o epítopo antigenico, es decir, la construcción de ácido nucleico se transfecta en el espacio intracelular de las células en un sujeto. Dicha construcción de ácido nucleico usará la maquinaria de traducción celular para producir una *cadena invariante - enlazador - epítopo* o *cadena invariante - epítopo* producto que interactuará con la molécula MHCII o la molécula MHC I - no contiene un antígeno - en un punto cuando dicha molécula MHC se localiza en el interior de la célula, tal como en un endosoma o MIIC. Por lo tanto, el efecto es interno y no es dependiente de la capacidad del dominio KEY de la cadena invariante de la construcción de proteína (que comprende los restos de aminoácidos LRMK) de competir para la carga sobre las moléculas MHC. De hecho, el efecto no es dependiente de la presencia de la región li-KEY y sus restos LRMK. Además, esto proporciona un efecto que puede amplificarse, ya que una construcción de ácido nucleico puede proporcionar el aumento de más de un producto.

El uso 'interno' de una construcción de ácido nucleico tiene diversas ventajas sobre el uso 'externo' de una construcción de proteína, como se ha detallado anteriormente: 1) Amplificación; la introducción de una pequeña cantidad de la construcción de ácido nucleico da lugar a muchos productos que pueden unirse a las moléculas de MHC, que también puede amplificarse secundariamente ya que dichos productos unidos a MHC pueden recircularse adicionalmente mediante internalización para aumentar en última instancia su expresión, 2) el uso del sistema de procesamiento de antígenos de las propias células asegura una correcta y estrecha unión del epítopo a la molécula MHC, 3) no existen requerimientos para los restos LRMK de la región li-KEY y el dominio li-CLIP nativo.

Optimización del codón y secuencias de ácido nucleico degenerado

La expresión de proteínas funcionales en hospedadores heterólogos es la piedra angular de la biotecnología moderna. Desafortunadamente, muchas proteínas son difíciles de expresar fuera de sus contextos originales. Pueden contener elementos reguladores limitantes de la expresión, provienen de organismos que utilizan códigos de nucleótidos no convencionales o de un gen abundante con codones raramente usados en el hospedador deseado. Las mejoras en la velocidad y la eficacia de la síntesis génica han hecho factible completar el rediseño del gen para la expresión máxima de la proteína. Por ejemplo, la expresión de la proteína puede mejorar drásticamente cuando la frecuencia del codón del gen bajo estudio se corresponde con la del sistema de expresión hospedador. Por ejemplo, una estrategia de rediseño puede incluir no solo el uso de sesgos óptimos del codón, sino también la alteración de elementos estructurales del ARNm y la modificación de la traducción y las regiones de inicio. Las personas expertas en la materia conocen las técnicas para la optimización de codones, y puede llevarse a cabo por suministradores comerciales tales como GenScript Corporation.

Se entiende que, la construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma de acuerdo con la divulgación puede optimizarse por codón de cualquier manera con el fin de producir - mediante traducción en la proteína, es decir, los aminoácidos - una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena invariante que corresponde a la secuencia de aminoácidos desvelada en la SEQ ID NO: 2 (li humana), o variantes de la misma de acuerdo con la divulgación.

Asimismo, la construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma de acuerdo con la divulgación puede optimizarse por codón de cualquier manera con el fin de producir - mediante traducción en la proteína, es decir, los aminoácidos - una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena invariante que corresponde a la secuencia de cualquier animal en el que se pueda usar la construcción de ácido nucleico para cebar una respuesta inmunitaria; incluyendo cualquier vertebrado, mamífero, pez o pájaro; o variantes de los mismos de acuerdo con la divulgación.

5 *Sesgo del codón:* Se ha identificado el sesgo del codón como el factor individual más importante en la expresión de un gen procariota. El grado al cual un codón dado aparece en el código genético varía significativamente entre organismos, entre proteínas expresadas a niveles alto y bajo e incluso entre diferentes porciones del mismo operón.

10 10 El motivo para esto es casi con certeza debido a que los codones preferidos se correlacionan con la abundancia de ARNt análogos disponible en el interior de la célula. Esta relación sirve para optimizar el sistema de traducción y para equilibrar la concentración de codones con la concentración del ARNt isoaceptor.

15 15 *Sustitución de codones usados infrecuentemente:* En general, cuantos más codones raros contenga un gen, menos probable es que la proteína heteróloga se exprese a un nivel razonable en este sistema hospedador. Estos niveles llegan a ser incluso menores si los codones raros aparecen en agrupaciones o en la parte del extremo N de la proteína. Sustituir los codones raros con otros que reflejan más estrechamente el sesgo del codón del sistema hospedador sin modificar la secuencia de aminoácidos puede aumentar los niveles de expresión de la proteína funcional.

20 20 *Codones problemáticos eliminados:* Cualquier codón que un organismo utilice menos de un 5 % a un 10% del tiempo puede causar problemas, sin importar de donde sea. De nuevo, los codones cercanos o adyacentes pueden alterar más la expresión de la proteína que lo que podrían por separado. Eliminar los codones raros y los codones que podrían leerse como señales de terminación puede evitar casos de expresión baja o inexistente.

25 25 *Expresión de proteínas víricas en hospedadores mamíferos:* Incluso los genes víricos pueden expresarse satisfactoriamente en líneas de células de mamíferos si el gen se prepara adecuadamente. La densa carga de información de los genes víricos da como resultado frecuentemente el solapamiento de los marcos de lectura. Muchos genes víricos codifican también las secuencias reguladoras negativas que actúan en *cis* en la secuencia de codificación. Los genes víricos pueden volverse a sintetizar no solo para expresar solo la proteína deseada sino también para alterar los elementos reguladores, potenciando por tanto la producción de proteína. La optimización del codón vírico es especialmente útil en la investigación de vacunas de ADN debido a que aumenta la inmunogenicidad de la diana.

30 30 *Otras restricciones:* Aunque el sesgo del codón juega un papel grande en la expresión génica, la elección de los vectores de expresión y de los promotores de la transcripción es también importante. Las secuencias de nucleótidos que rodean la región del extremo N de la proteína son particularmente sensibles, tanto a la presencia de codones raros como a las identidades inmediatamente adyacentes al AUG de inicio. Existe también alguna interacción entre la traducción y la estabilidad del ARNm.

35 35 *Degeneración del código genético*

40 40 La continuación de lo anterior es que el código genético tiene redundancia pero no ambigüedad. Por ejemplo, aunque los codones GAA y GAG son ambos específicos del ácido glutámico (redundancia), ninguno de ellos especifica ningún otro aminoácido (sin ambigüedad) (véase la tabla de codones por debajo de la correlación completa). Los codones que codifican un aminoácido pueden diferir en cualquiera de sus tres posiciones. La degeneración del código genético es la que cuenta para la existencia de mutaciones silenciosas. Los resultados de la degeneración son debidos a un código de triplete de cuatro bases que designa 20 aminoácidos y un codón de detención.

Ala/A	GCU. GCC. GCA. GCG	Leu/I	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Arg/R	CGU. CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Lys/K	AAA. AAG
Asn/N	AAU, AAC	Met/M	AUG
Asp/D	GAU. GAC	Phe/F	UUU, UUC
Cys/C	UGU. UGC	Pro/P	CCU, CCC, CCA, CCG
Gln/Q	CAA, CAG	Ser/S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Glu/E	GAA, GAG	Thr/T	ACU, ACC, ACA, ACG
Gly/G	GGU, GGC, GGA, GGG	Trp/W	UGG
His/H	CAU, CAC	Tyr/Y	UAU, UAC
Ile/I	AUU. AUC. AUA	Val/V	GUU, GUC, GUA, GUG
START	AUG	STOP	UAG, UGA, UAA

La tabla muestra los 20 aminoácidos, los codones de inicio y detención y los 64 posibles codones. La dirección del ARNm es de 5' a 3'.

Sustitución sinónima

Las mutaciones o sustituciones silenciosas son mutaciones de ADN que no dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de una proteína. Se pueden producir en una región no codificante (fuera de un gen o dentro de un intrón), o se pueden producir dentro de un exón de una manera que no altera la secuencia final de aminoácidos.

- 5 La frase mutación o sustitución silenciosa se usa a menudo de forma indistinta con la frase mutación o sustitución sinónima; sin embargo, las mutaciones o sustituciones sinónimas son una subcategoría de anterior, que se produce solo en los exones.

Se entiende que, la construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma de acuerdo con la divulgación puede comprender una sustitución sinónima con el fin de producir - mediante traducción en la proteína, es decir, los aminoácidos - una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena invariante que corresponde a la secuencia de aminoácidos desvelada en la SEQ ID NO: 2 (li humana), o variantes de la misma de acuerdo con la divulgación.

10 Asimismo, la construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante de acuerdo con la divulgación puede comprender una sustitución sinónima con el fin de producir - mediante traducción en la proteína, es decir, los aminoácidos - una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena invariante que corresponde a la secuencia de cualquier animal en el que se pueda usar la construcción de ácido nucleico para cavar una respuesta inmunitaria; incluyendo cualquier vertebrado, mamífero, pez o pájaro; o variantes de los mismos de acuerdo con la divulgación.

Sustitución no sinónima en aminoácidos sinónimos

15 Una sustitución no sinónima produce un cambio en el aminoácido. Sin embargo, los aminoácidos se agrupan de acuerdo con las propiedades de dicho aminoácido, y la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido puede no tener impacto de la función o las propiedades de la proteína que comprende dicho aminoácido si la sustitución da como resultado un aminoácido sinónimo. Dichas sustituciones pueden denominarse sustitución o mutación conservativa: Un cambio en la secuencia de ADN o ARN que conduce a la sustitución de un aminoácido por uno bioquímicamente similar.

20 25 Se entiende por tanto, que la construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma de acuerdo con la divulgación puede comprender una sustitución no sinónima con el fin de producir - mediante traducción en la proteína, es decir, los aminoácidos - una secuencia de aminoácidos que comprende una variante de una cadena invariante, en el que dicha sustitución no sinónima da como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos que son sinónimos.

30 35 40 Las sustituciones sinónimas pueden comprender la sustitución de un aminoácido hidrófobo con otro aminoácido hidrófobo; la sustitución de un aminoácido hidrófilo con otro aminoácido hidrófilo; la sustitución de un aminoácido polar con otro aminoácido polar; la sustitución de un aminoácido no polar con otro aminoácido no polar; la sustitución de un aminoácido cargado positivamente con otro aminoácido cargado positivamente; la sustitución de un aminoácido cargado negativamente con otro aminoácido cargado negativamente; la sustitución de un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro; la sustitución de un aminoácido ambiguo con su aminoácido equivalente cargado de forma ambigua, tal como isoleucina y leucina, asparagina y ácido aspártico y glutamina y ácido glutámico; la sustitución de un aminoácido aromático con otro aminoácido aromático; la sustitución de un aminoácido alifático con otro aminoácido alifático; o la sustitución de cualquier aminoácido con alanina. Estas sustituciones pueden denominarse sustituciones de valores iguales.

Variantes de corte y empalme

45 El corte y empalme alternativo es el mecanismo de variación del corte y empalme del ARN en el que los exones del transcripto del gen primario, el pre-ARNm, se separan y se reconectan con el fin de producir disposiciones de ribonucleótidos alternativos. Estas combinaciones lineales experimentan a continuación el proceso de traducción donde se especifican secuencias específicas y únicas de aminoácidos, dando como resultado proteínas de isoformas o variantes de corte y empalme. De esta manera, el corte y empalme alternativo utiliza la expresión genética para facilitar la síntesis de una variedad mayor de proteínas. En eucariotas, el corte y empalme alternativo es una etapa importante hacia una mayor eficacia, debido a que la información se puede almacenar mucho más económicamente. Algunas proteínas pueden codificarse en una secuencia de ADN cuya longitud sería suficiente solo para dos proteínas en la maniera procarionta de codificar.

50 55 La construcción de ácido nucleico de la divulgación puede diseñarse en una realización con el fin de proporcionar un aumento a múltiples péptidos antigenéticos de fragmentos de péptidos antigenéticos y/o múltiples cadenas invariantes o variantes de los mismos.

En una realización, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que comprenden al menos 1, tal como 2, por ejemplo 3, tal como 4, por ejemplo 5, tal como 6, por ejemplo 7, tal como 8, por ejemplo 9, tal como 10, por ejemplo 11, tal como 12, por ejemplo 13, tal como 14, por ejemplo 15, tal como 16, por ejemplo 17, tal como 18, por ejemplo 19, tal como 20 variantes de corte y empalme de un péptido o fragmento antigenético de dicho péptido antigenético.

Las más de una variantes de corte y empalme de péptidos puede abarcar péptidos antigenicos idénticos o no idénticos.

En otra realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación comprende al menos 1, tal como 2, por ejemplo 3, tal como 4, por ejemplo 5, tal como 6, por ejemplo 7, tal como 8, por ejemplo 9, tal como 10, por ejemplo 11, tal como 12, por ejemplo 13, tal como 14, por ejemplo 15, tal como 16, por ejemplo 17,

5 tal como 18, por ejemplo 19, tal como 20 variantes de corte y empalme de una cadena invariante o variantes de las mismas.

La más de una variante de corte y empalme de una cadena invariante puede abarcar una cadena invariante idéntica o no idéntica o las variantes de la misma.

10 En una realización de la divulgación, al menos una variante de corte y empalme de la cadena invariante comprende la cadena invariante de longitud completa nativa. En otra realización de la divulgación, al menos una variante de corte y empalme de la cadena invariante comprende una variante de la cadena invariante. En otra realización más de la divulgación, al menos una variante de corte y empalme de la cadena invariante comprende una variante de la cadena invariante en la que dicha li no comprende los restos de aminoácidos LRMK de la región li-KEY. En otra realización de la divulgación, al menos una variante de corte y empalme de la cadena invariante comprende una variante de la cadena invariante en la que dicha li no comprende los restos M91 y M99 del dominio CLIP.

15 Resulta que la variante de corte y empalme puede comprender cualquier combinación de péptidos antigenicos idénticos o no idénticos y/o una cadena invariante idéntica o no idéntica o las variantes de la misma.

De esta manera es posible 'intercambiar' secuencias (exones) que comprenden diferentes dominios o regiones de una cadena invariantes, con el fin de obtener variantes de una cadena invariante mediante corte y empalme alternativo.

20 De esta manera, es también posible 'intercambiar' secuencias (exones) que comprenden diferentes dominios o regiones del(de los) péptido(s) antigenico(s), con el fin de obtener variantes de dicho(s) péptido(s) antigenico(s) mediante corte y empalme alternativo.

Cadena invariante

25 La cadena invariante (li) o la cadena invariante asociada a MHC de clase II o CD74 o p31, es una proteína de membrana integral de tipo II no polimorfa, véanse las SEQ ID NOS: 2 y 4 para las secuencias de aminoácidos de li humana y de ratón, respectivamente, e igualmente las SEQ ID NOS: 1 y 3 para las secuencias de ácidos nucleicos de li humana y de ratón, respectivamente. La cadena invariante tiene múltiples funciones en la maduración de los linfocitos y en las respuestas inmunitarias adaptativas, dirigiéndose en particular a compartimentos lisosómicos donde la secuencia CLIP puede ocupar moléculas MHC de clase II hasta que estas se fusionan con compartimentos endosómicos (Pieters J. 1997, Curr. Opin. Immunol., 9:8996). Adicionalmente, li ha mostrado funcionar como una chaperona MHC de clase I (Morris y col, 2004, Immunol. Res. 30:171-179) y mediante su secuencia de direccionamiento endosómico, para facilitar la proliferación de CD4⁺, pero no de los linfocitos T CD8⁺ dirigidos contra el antígeno unido covalentemente (Diebold y col., 2001, Gene Ther. 8:487-493).

35 La proteína de la cadena invariante comprende varios dominios: un dominio citosólico que incluye un péptido de señalización o clasificación (conocido también como la secuencia de direccionamiento lisosómico), un dominio transmembrana, y un dominio luminal que en sí mismo comprende una región CLIP, una región KEY (que comprende los restos LRMK), un dominio nuclear y un dominio de trimerización. Ambos de estos dominios están flanqueados por regiones muy flexibles (Strumpter-Cuvelette & Benaroch, 2002, Biochem. Biophys. Acta., 1542:1-13). La cadena invariante se ha caracterizado en diversos organismos, incluyendo vertebrados (por ejemplo, pollos), mamíferos (por ejemplo, vacas, perros, ratones y ratas) y seres humanos.

40 La divulgación se refiere a construcciones de ácidos nucleicos que comprenden secuencias en las que al menos una cadena invariante o variante de la misma es específica de organismo o puede estar relacionada con un organismo específico. Preferentemente, al menos una cadena invariante es de origen vertebrado, más preferentemente de origen mamífero y lo más preferente de origen humano. En relación a esto, la secuencia definida por la SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ácido nucleico de la cadena invariante de ser humano. En otra realización preferida de la divulgación, al menos una cadena invariante es de origen aviar, los más preferido de Gallus gallus doméstico (pollo). En otra realización más preferida de la divulgación, al menos una cadena invariante se deriva de peces, lo más preferido, de peces que se pueden criar en una granja piscícola (tal como salmón o trucha). En otra realización más preferida de la divulgación, al menos una cadena invariante se deriva de un hurón.

45 50 La cadena invariante empleada emplead es preferentemente la cadena invariante del organismo que es para recibir la construcción de ácido nucleico. Es un objeto de la divulgación que la cadena invariante y los organismos hospedadores o receptores del tratamiento son las mismas especies.

55 En una realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico que comprende al menos una cadena invariante o variante de la misma es con la condición de que cuando la construcción de ácido nucleico comprende una variante de al menos una cadena invariante, dicha cadena invariante no comprende los restos de los aminoácidos LRMK de la de la secuencia li-KEY.

En otra realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico que comprende al menos una cadena invariante o variante de la misma es con la condición de que cuando la construcción de ácido nucleico comprende una variante de al menos una cadena invariante, dicha cadena invariante comprende una variante del dominio li-CLIP. Dicha variante es, en una realización de la divulgación, una sustitución de metionina en las posiciones 91 y 99 con otro aminoácido. Dicha variante es, en otra realización una mutación puntual doble M91A M99A (sustitución del aminoácido metionina por alanina en las posiciones 91 y 99).

En otra realización de la divulgación, la variante li es una delección de los primeros 17 aminoácidos de li ($\Delta 17li$).

En una tercera realización de la divulgación, la variante li comprende una sustitución de metionina en las posiciones 91 y 99 y una delección de los primeros 17 aminoácidos de li.

10 Los inventores han encontrado de forma sorprendente, que los restos LRMK del dominio li-KEY no son esenciales para ceder una respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención.

Asimismo, los inventores han encontrado de forma sorprendente que la sustitución de la metionina en las posiciones 91 y 99 de li aumenta la presentación de MHCII.

15 Además, los inventores han encontrado que la delección de los primeros 17 aminoácidos de li aumenta de forma sorprendente la respuesta de memoria.

Los inventores han encontrado además que la parte central de la cadena invariante que comprende los restos número 50 a 118 es esencial para obtener el efecto completo de li. Esta variante de li carece de un dominio de trimerización. Por tanto, en una realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico comprende al menos una cadena invariante o variante de la misma en la que dicha cadena invariante comprende los restos de aminoácidos números 20 50 a 118 acoplados al dominio de trimerización de otra proteína. Dicha proteína diferente puede por ejemplo ser una proteína bacteriana o una proteína de fibra adenovírica.

La divulgación se refiere también a una construcción de ácido nucleico en la que al menos una cadena invariante codificada es un fragmento de la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 2 de al menos 40 aminoácidos y de al menos un 85 % de identidad con el mismo fragmento de la SEQ ID NO: 2.

25 El fragmento es un fragmento de al menos 40 aminoácidos procedentes de cualquier parte de la cadena invariante como se muestra en la SEQ ID NO: 2. Esta incluye un fragmento que incluye los restos 1 a 40, 10 a 50, 20 a 60, 25 a 65, 30 a 70, 35 a 75, 40 a 80, 45 a 85, 50 a 90, 55 a 95, 60 a 100, 65 a 105, 70 a 110, 75 a 115, 80 a 120, 85 a 125, 90 a 130, 95 a 135, 100 a 140, 105 a 145, 110 a 150, 115 a 155, 120 a 160, 125 a 165, 130 a 170, 135 a 175, 140 a 180, 145 a 185, 150 a 190, 155 a 195, 160 a 200, 165 a 205, 170 a 210 y 175 a 216. esto incluye también fragmentos

30 como cualquiera de los anteriores relacionados que se expanden hasta 5 restos a cada lado del mismo. esto incluye además fragmentos de al menos 50 restos, de al menos 60 restos, de al menos 70 restos, de al menos 80 restos, de al menos 90 restos, de al menos 100 restos, de al menos 110 restos, de al menos 120 restos, de al menos 130 restos, de al menos 140 restos, de al menos 150 restos, de al menos 160 restos, de al menos 170 restos, de al menos 180 restos, de al menos 190 restos, de al menos 200 restos y de al menos 210 restos.

35 Cualquiera de los fragmentos anteriormente descritos de al menos un 85 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 90 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 91 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 92 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 93 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 94 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 96 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 97 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 98 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, un 99 % de identidad de la secuencia con la SEQ ID NO: 2 se incluyen en el ámbito de la divulgación.

La identidad/homología entre las secuencias de aminoácidos puede calcularse usando matrices de puntuación bien conocidas tales como una cualquiera de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, y BLOSUM 90.

45 En una realización, la divulgación es una construcción de ácido nucleico en la que al menos una cadena invariante codificada es un fragmento de la SEQ ID NO: 2 de al menos 186 aminoácidos. Esto incluye cualquiera de los fragmentos que se han definido anteriormente, y que comparten por tanto identidad con la secuencia de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2.

50 La divulgación se refiere además a una construcción de ácido nucleico en la que al menos una cadena invariante codificada es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Esto abarca que cualquier secuencia derivada de la cadena invariante que se presenta en la SEQ ID NO: 2 de al menos un 85 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 90 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 91 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 92 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 93 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 94 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 96 % de identidad de la secuencia, por ejemplo,

al menos un 97 % de identidad de la secuencia, tal como al menos un 98 % de identidad de la secuencia, por ejemplo, 99 % de homología de la secuencia con la SEQ ID NO: 2 se incluyen en el ámbito de la divulgación. Esto incluye secuencias que son tanto más largas como más cortas que la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 2.

5 Cualquiera de las secuencias anteriormente descritas independientemente del origen, la identidad de la secuencia o la longitud a partir de ahora en adelante denominadas variantes de una cadena invariante.

Resulta que está comprendido en el ámbito de la divulgación que una variante de la cadena invariante de cualquier organismo puede ser una variante de acuerdo con la anterior, es decir, que la variante puede alterarse en la región li-KEY y/o alterarse en la región li-CLIP y/o ser un fragmento de la cadena invariante de un organismo y/o ser al menos un 85 % idéntica a dicha cadena invariante tanto sobre toda la secuencia de la cadena invariante como dentro del fragmento de la misma. La cadena invariante puede ser también de una especie relacionada de organismo o ser de una especie relacionada de forma distante.

10 15 otro aspecto de la divulgación se refiere a la adición, eliminación o sustitución de regiones, péptidos o dominio de al menos una cadena invariante codificada por la construcción de ácido nucleico. La eliminación de una o más de estas regiones, péptidos o dominios truncará la cadena invariante resultante. La adición o sustitución de una región, péptido o dominio incluye las opciones de seleccionar estas secuencias de las fuentes conocidas tales como las proteínas o polipéptidos de origen natural o de polipéptidos sintetizados artificialmente o de los restos de ácidos nucleicos que codifican los mismos. La adición de regiones, dominios o péptidos incluye la opción de añadir uno, dos o más de cada tipo o de diferentes tipos de regiones, dominios, péptidos y uno, dos, tres o más de los ácidos nucleicos que codifican estas regiones, dominios y péptidos. Estos pueden ser idénticos o diferir entre sí basándose en la secuencia. Las 20 regiones, Péptidos y dominios no necesitan surgir del mismo organismo que la cadena invariante de la estructura principal.

25 La eliminación de regiones, dominios o péptidos incluye la opción de eliminar uno, dos, tres o más de cada tipo o de diferentes tipos de regiones, dominios, péptidos y eliminar uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, diecisésis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más de los restos de aminoácidos que codifican estas regiones, dominios y péptidos. Es bien conocido en la materia llevar a cabo adiciones, 30 35 40 deleciones y sustituciones individuales así como tramos de nucleótidos que codificarán el polipéptido resultante.

El alineamiento del ácido nucleico y especialmente de las secuencias de proteínas de genes homólogos o proteínas de diferentes organismos puede ser de gran ayuda cuando se determinan qué sustituciones, deleciones, 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 1029

comprendidos en los 30 restos de la región KEY.

Una realización más preferida de la divulgación comprende una o más sustituciones o delecciones de la región KEY, que dan como resultado la sustitución o delección de uno, dos, tres o cuatro restos de aminoácidos de los aminoácidos LRMK comprendidos en la región KEY. En una realización, al menos uno, tal como dos, por ejemplo tres, tal como cuatro de los aminoácidos LRMK comprendidos en la región KEY se eliminan. En otra realización de la divulgación, al menos uno, tal como dos, por ejemplo tres, tal como cuatro de los aminoácidos LRMK comprendidos en la región KEY están sustituidos por otros aminoácidos. Dichos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: G (glicina), P (prolina), A (alanina), V (valina), L (leucina), I (isoleucina), M (metionina), C (cisteína), F (fenilalanina), Y (tirosina), W (triptófano), H (histidina), K (lisina), R (arginina), Q (glutamina), N (asparagina), E (ácido glutámico), D (ácido aspártico), S (serina) y T (treonina).

En una realización particular, Los restos de aminoácidos LRMK están cada uno sustituidos con los restos del aminoácido alanina (A), por tanto, la secuencia se lee: AAAA. En otra realización, Los restos de aminoácidos LRMK están sustituidos con aminoácidos que comprenden sustituciones sinónimas o de igual valor. Por ejemplo, El resto de aminoácido L puede estar sustituido con I, V, M o F; R puede estar sustituido con K, H, E o D; M puede estar sustituido con L, I, F o V; y K puede estar sustituido con H o R.

En una realización de la divulgación, La región KEY puede comprender más de los restos LRMK, o los restos LRMK pueden estar sustituidos con una secuencia de más de cuatro restos de aminoácidos.

La presente invención se refiere a fragmentos de una cadena invariante como se ha descrito anteriormente sin la región KEY. Estos fragmentos tienen al menos 15 restos de longitud. Se desvelan también fragmentos de una cadena invariante en los que el péptido de señalización está eliminado y el fragmento de la cadena invariante tiene al menos 10 restos de aminoácidos de longitud, al menos 15 restos, al menos 20 restos, al menos 25 restos, al menos 30 restos, al menos 35 restos, al menos 50 restos, al menos 60 restos, al menos 70 restos, al menos 80 restos, al menos 90 restos, al menos 100 restos, al menos 110 restos, al menos 120 restos, al menos 130 restos, al menos 140 restos, al menos 150 restos, al menos 160 restos, al menos 170 restos, o al menos 180 restos de longitud.

En una realización de la divulgación, la al menos una cadena invariante codificada por la construcción de ácido nucleico que se describe en el presente documento no comprende los restos de aminoácidos LRMK de la región li-KEY.

En una realización, la divulgación se refiere por tanto a una construcción de ácido nucleico que comprende al menos una cadena invariante o una variante de la misma, unida a al menos una proteína o péptido antigenérico o un fragmento antigenérico de dicha proteína o péptido, en el que dicha cadena invariante o variante de la misma no comprende los restos de los aminoácidos LRMK de la región li-KEY.

Región CLIP

Otra realización de la divulgación se refiere a la eliminación, adición o sustitución de la región CLIP de al menos una cadena invariante. Como se ha descrito anteriormente, la adición o reemplazo de la región CLIP incluye las opciones de añadir o sustituir la región CLIP existente en la variante de la cadena o cadenas invariantes seleccionadas, con regiones CLIP de las cadenas invariantes del mismo u otros organismos o de las variantes de las regiones CLIP del mismo u otros organismos. Las regiones CLIP variantes pueden, como se desprende lo anterior, generar específicamente versiones mutadas de la región CLIP, generarse mediante sustituciones individuales o múltiples de ácidos nucleicos, delecciones o adiciones. Una realización preferida de la divulgación comprende solo la región CLIP, o la región CLIP junto con la secuencia adyacente en el extremo N o la secuencia adyacente en el extremo C sin ninguna otra región o dominio de la cadena invariante. Otras realizaciones preferidas de la divulgación comprenden solo las secuencias adyacentes en el extremo N o el extremo C a la región CLIP, pero sin la propia región CLIP. por adyacente se entiende cualesquiera aminoácidos comprendidos en los 10 restos de la región CLIP, comprendidos en los 20 restos, comprendidos en los 30 restos, comprendidos en los 40 restos, comprendidos en los 50 restos, comprendidos en los 75 restos o comprendidos en los 100 restos de la región CLIP.

En una realización preferida de la divulgación comprende una o más sustituciones o delecciones de la región CLIP, que dan como resultado la sustitución o delección de uno, dos, tres, cuatro o más restos de aminoácidos de la región CLIP. En una realización de la divulgación, al menos uno, tal como dos, por ejemplo tres, tal como cuatro o más de los aminoácidos comprendidos en la región CLIP se eliminan. En otra realización de la divulgación, al menos uno, tal como dos, por ejemplo tres, tal como cuatro o más de los aminoácidos comprendidos en la región CLIP están sustituidos por otros aminoácidos. Dichos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: G (glicina), P (prolina), A (alanina), V (valina), L (leucina), I (isoleucina), M (metionina), C (cisteína), F (fenilalanina), Y (tirosina), W (triptófano), H (histidina), K (lisina), R (arginina), Q (glutamina), N (asparagina), E (ácido glutámico), D (ácido aspártico), S (serina) y T (treonina).

En una realización de la presente divulgación se refiere a fragmentos de una cadena invariante como se ha descrito anteriormente sin la región CLIP. Estos fragmentos pueden tener al menos 5 restos de aminoácidos de longitud, al menos 10 restos, al menos 15 restos, al menos 20 restos, al menos 25 restos, al menos 30 restos o al menos 35 restos de longitud. Otra realización de la divulgación se refiere a fragmentos de una cadena invariante en los que el péptido de señalización está eliminado y el fragmento de la cadena invariante tiene al menos 10 restos de aminoácidos de

longitud, al menos 15 restos, al menos 20 restos, al menos 25 restos, al menos 30 restos, al menos 35 restos, al menos 50 restos, al menos 60 restos, al menos 70 restos, al menos 80 restos, al menos 90 restos, al menos 100 restos, al menos 110 restos, al menos 120 restos, al menos 130 restos, al menos 140 restos, al menos 150 restos, al menos 160 restos, al menos 170 restos, o al menos 180 restos de longitud.

- 5 En una realización particular de la divulgación, Los M restos de aminoácidos en las posiciones 91 y 99 están cada uno sustituidos con los restos del aminoácido alanina (A), por tanto, la secuencia se lee: M91A M99A. En otra realización de la divulgación, Los M restos de aminoácidos en las posiciones 91 y 99 están sustituidos con aminoácidos que comprenden sustituciones sinónimas o de igual valor.

10 En una realización de la divulgación, la al menos una cadena invariante codificada por la construcción de ácido nucleico que se describe en el presente documento no comprende los M restos de aminoácidos en las posiciones 91 y 99 de la secuencia li-CLIP.

15 En una realización, la divulgación se refiere por tanto a una construcción de ácido nucleico que comprende al menos una cadena invariante o una variante de la misma, unida a al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido, en el que dicha cadena invariante o variante de la misma no comprende los M restos de aminoácidos en las posiciones 91 y 99 de la región li-CLIP.

Alteraciones en el extremo N o el extremo C:

Una realización de la divulgación se refiere a la eliminación (deleción), sustitución o reemplazo de las regiones de las regiones del extremo N o el extremo C de al menos una cadena invariante. Como se ha descrito anteriormente, la adición o reemplazo de las regiones del extremo N o C incluyen las opciones de añadir o sustituir las regiones del extremo N o C en la variante de la cadena o cadenas invariantes seleccionadas, con las regiones del extremo N o C de las cadenas invariantes u otras proteínas del mismo u otros organismos o de las variantes de las regiones del extremo N o C del mismo u otros organismos. Las regiones del extremo N o C variantes pueden, como se desprende lo anterior, generar específicamente versiones mutantes de las regiones del extremo N o C, generarse mediante sustituciones individuales o múltiples de ácidos nucleicos, delecciones o adiciones.

25 Una realización de la divulgación comprende la delección los primeros (extremo N) o último (extremo C) aminoácidos de li, tal como los primeros o últimos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 30 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 aminoácidos de li.

En una realización particular de la divulgación, la variante li comprende una delección de los primeros 17 aminoácidos de li ($\Delta 17li$).

Una realización de la divulgación se refiere a fragmentos de una cadena invariante como se ha descrito anteriormente sin las regiones de los extremos N o C. Estos fragmentos pueden tener al menos 5 restos de aminoácidos de longitud, al menos 10 restos, al menos 15 restos, al menos 20 restos, al menos 25 restos, al menos 30 restos o al menos 35 restos de longitud. Otras realización se refiere a fragmentos de una cadena invariante en los que el péptido de señalización está eliminado y el fragmento de la cadena invariante tiene al menos 10 restos de aminoácidos de longitud, al menos 15 restos, al menos 20 restos, al menos 25 restos, al menos 30 restos, al menos 35 restos, al menos 50 restos, al menos 60 restos, al menos 70 restos, al menos 80 restos, al menos 90 restos, al menos 100 restos, al menos 110 restos, al menos 120 restos, al menos 130 restos, al menos 140 restos, al menos 150 restos, al menos 160 restos, al menos 170 restos, o al menos 180 restos de longitud.

40 En una realización de la divulgación, todo o parte del segmento transmembrana de li puede estar sustituido con el correspondiente segmento de otra proteína cualquiera, tal como el receptor de la quimioquina CCR6 TM6.

45 En otra realización de la divulgación, todo o parte del segmento transmembrana de li puede estar sustituido con el correspondiente segmento del receptor de quimioquina CCR6 TM6.

Péptido de señalización

50 Otra realización de la divulgación se refiere a al menos una cadena invariante en la que el péptido de señalización se elimina, sustituye o añade en la secuencia que codifica la cadena invariante. Un péptido de señalización es una secuencia corta de aminoácidos que determina la localización eventual de una proteína en la célula, denominado también péptido clasificador. Los péptidos de señalización que determinan la localización de las proteínas en compartimentos subcelulares tales como el retículo endoplásmico, el aparato de golgi y los diversos compartimentos que comprenden el aparato de golgi, el núcleo, la membrana plasmática, la mitocondria y los diversos espacios y membranas en el presente documento, peroxisomas, lisosomas, endosomas y las vesículas secretoras entre otras, están todas incluidas en el ámbito de la divulgación. Una realización preferida de la divulgación comprende solo la secuencia de direccionamiento lisosómica de la cadena invariante.

Antígeno

Cualquiera de las anteriores variantes de la cadena invariante están abarcadas en la divulgación en la forma en la que al menos una de dichas variantes está unida operativamente a al menos un antígeno tal como una proteína o péptido antigénico o un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido.

5 Es un objeto de la presente invención incluir, aunque no de forma limitativa las proteínas o péptidos antigénicos o los fragmentos de dichas proteínas o péptidos para proceder de organismos patógenos, polipéptidos y antígenos específicos de cáncer, y las proteínas o péptidos asociados con una respuesta fisiológica anómala.

Más preferentemente, es un objeto de la presente invención incluir un antígeno que se origina de cualquiera de los siguientes tipos de patógenos: virus, microorganismos y parásitos. Esto incluye los patógenos de cualquier animal conocido. Es preferible tener un antígeno procedente de un patógeno de mamífero, es decir, un patógeno que se dirige específicamente a animales mamíferos tales como un hurón. Se prefiere tener un antígeno procedente de un patógeno humano. En general, puede utilizarse cualquier antígeno que se encuentra que está asociado con un patógeno o enfermedad humana.

10 15 En otra realización, es preferible tener un antígeno de un patógeno aviar, es decir, un patógeno que se dirige específicamente a pájaros o aves de corral. Es más preferido tener un antígeno procedente de un pollo (*gallus gallus domesticus*). En general, se puede usar cualquier antígeno que se encuentra que está asociado con un patógeno aviar.

20 25 En otra realización más, es preferible tener un antígeno procedente de un patógeno de piscina, es decir, un patógeno que se dirige específicamente a peces. Es más preferido tener un antígeno de un pez que se puede criar en una piscifactoría. En general, se puede usar cualquier antígeno que se encuentra que esta asociado con un patógeno de piscina.

Antígenos víricos

En una realización preferida, al menos un antígeno puede originarse de, aunque no de forma limitativa de cualquiera de las siguientes familias de virus: Adenovirus, arenaviridae, astroviridae, bunyaviridae, caliciviridae, coronaviridae, 25 flaviviridae, herpesviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, picornaviridae, poxviridae, reoviridae, retroviridae, rhabdoviridae y togaviridae.

Más específicamente, al menos un antígeno o secuencia antigénica puede derivarse de cualquiera de los siguientes virus: Gripe A tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), Gripe B, virus de la gripe C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, Rotavirus, cualquier virus del grupo del virus de Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, Virus de la fiebre del Dengue, Viruela del mono, Mononegavirales, Lyssavirus tales como el virus de la rabia, Virus del murciélagos de Lagos, Virus Mokola, Virus Duvenhage, Virus del murciélagos europeo 1 y 2 y virus del murciélagos australiano, Efemovirus, Vesiculovirus, Virus de la estomatitis vesicular (VEV), Herpesvirus tales como el virus del herpes simple tipos 1 y 2, varicela zóster, citomegalovirus, Virus de Epstein-Bar (VEB), herpesvirus humanos (HVH), herpesvirus humanos tipo 6 y 8, Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, gammaherpesvirus de murino, Arenavirus tales como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, Virus de la fiebre hemorrágica boliviana, Virus de la fiebre hemorrágica asociado a Sabia, Virus de la fiebre hemorrágica venezolana, Virus de la fiebre de Lassa, Virus Machupo, Virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML), Bunyaviridae tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, virus productor de síndrome renal con fiebre hemorrágica, Virus de la fiebre del valle del Rift, Filoviridae (filovirus) incluyendo fiebre hemorrágica del Ébola y fiebre hemorrágica de Marburgo, Flaviviridae incluyendo virus de la enfermedad del bosque Kaysanur, Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, Virus productor de encefalitis transmitida por garrapata y Paramyxoviridae tales como virus Hendra y virus Nipah, variola mayor y variola minor (viruela), alfavirus tales como el virus de la encefalitis equina venezolana, virus de encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, Coronavirus asociado a SARS (SARS-CoV), virus del Nilo occidental, cualquier virus productor de encefalitis.

45 En una realización preferida de la invención la al menos una proteína o péptido antigénico procede de un virus seleccionado entre el grupo de: VIH, virus de la hepatitis C, virus de la gripe, virus del herpes, Lassa, Ébola, viruela, Gripe aviar, filovirus, Marburgo, y virus del papiloma.

50 En una realización más preferida de la invención a al menos una proteína o péptido antigénico se selecciona entre el grupo de y/o puede ser al menos un fragmento antigénico de cualquiera de las siguientes: glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP); Gripe A NS-1 (proteína 1 no estructural), M1 (proteína 1 de matriz), NP (nucleoproteína), NEP, M2, M2e, HA, NA, PA, PB1, PB2, PB1-F2; LCMV NP, LCMV GP; Ébola GP, Ébola NP; antígenos tat de VIH, vif, rev, vpr, gag, pol, nef, env, vpu; antígenos tat en VIS, vif, rev, vpr, gag, pol, nef, env; gammaherpesvirus M2 de murino, M3 y ORF73 (tal como MHV-68 M2, M3 y ORF73); Ovoalbúmina de pollo (OVA); o 55 un epítopo de un linfocito T auxiliar. Está comprendido en el ámbito de la invención combinar dos o más de cualquiera de los antígenos mencionados en el presente documento.

Antígenos de microorganismos

Una realización de la presente invención incluye al menos una proteína o péptido antigenólico procedente de un microorganismo. Más específicamente, se puede derivar al menos un antígeno de uno de la siguiente lista no exhaustiva: Ántrax (*Bacillus anthracis*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonela* (*Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. dublin*, *S. typhimurium*), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter* tal como *Campylobacter jejuni*, *Cryptococcus neoformans*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Leptospira*, *Legionella pneumophila*, *Borrelia burgdorferi*, Especies de *Streptococcus* tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, Especies de *Vibrio* tales como *Vibrio cholerae O1*, *V. cholerae* no O1, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. carchariae*, *V. hollisae*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*, *V. damsela*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas veronii*, *Plesiomonas shigelloides*, Especies de *Shigella* tales como *Shigella sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri*, y *S. dysenteriae*, *Escherichia coli* Enterovirulenta EEC (*Escherichia coli* - enterotoxigena (ETEC), *Escherichia coli* - enteropatogena (EPEC), *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* - enteroinvasiva (EIEC)), Especies de estafilococos, tales como *S. aureus* y especialmente especies resistentes a intermedios de vancomicina (VISA/VRSA) o las especies resistentes a multifármacos (MRSA), especies de *Shigella*, tales como *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *Cryptosporidium parvum*, especies de *Brucella* tales como *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, y *B. canis*, *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*.

En una realización preferida de la invención la al menos una proteína o péptido antigenólico procede de un microorganismo seleccionado entre el grupo de: *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, especies de *Staphylococcus*, y especies de *Vibrio*.

Antígeno parasítico

Una realización de la invención se refiere a una construcción de ácido nucleico, en la que al menos una proteína o péptido antigenólico codificado es de un parásito.

Otra realización de la presente invención se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende combinaciones de al menos dos proteínas o péptidos antigenicos de cualquiera de los patógenos anteriormente mencionados.

Preferentemente, el antígeno se deriva de, aunque no de forma limitativa, un parásito seleccionado entre el grupo de: especies de *Plasmodium* tales como *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Endolimax nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium muris*, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, especies de *Acanthamoeba* tales como *Acanthamoeba castellanii*, y *A. culbertsoni*, *Naegleria fowleri*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Isospora belli*, *Balantidium coli*, Ascáride (*Ascaris lumbricoides*), *Anquilostoma* (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenal*), Lombriz intestinal (*Enterobius vermicularis*), Lombrices (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*), Gusano del corazón (*Dirofilaria immitis*), Strongyloides (*Strongyloides stercoralis*), Triquina (*Trichinella spiralis*), Filaria (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Mansonella perspants*, *Mansonella ozzardi*), y larvas de anisakis (*Anisakis simplex* (gusano del arenque), *Pseudoterranova* (*Phocanema*, *Terranova*) decípiens (gusano del bacalao o de la foca), especies de *Contracaecum*, e *Hysterothylacium* (especies de *Thynnascaris*) *Trichuris trichiura*, Lombriz solitaria (*Taenia saginata*), Solitaria del cerdo (*Taenia solium*), Solitaria del pescado (*Diphyllobothrium latum*), y Solitaria del perro (*Dipylidium caninum*), Trematosis intestinal (*Fasciolopsis buski*), Esquistosomiasis (*Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* *Schistosoma haematobium*), *Fasciola hepática* (*Clonorchis sinensis*), Duela pulmonar oriental (*Paragonimus westermani*), y *Fasciola hepática* de la oveja (*Fasciola hepatica*), *Nanophyetus salmincola* y *N. schikhobalowi*.

En una realización preferida de la invención la al menos una proteína o péptido antigenólico procede de un parásito seleccionado entre el grupo de: especies de *Plasmodium*, especies de *Leishmania*, y especies de *Trypanosoma*.

El al menos un antígeno de la presente invención puede ser Var2Csa de *Plasmodium falciparum*. En una realización preferida de la invención, la al menos una proteína o péptido antigenólico o fragmento de una proteína o péptido antigenólico es Var2Csa.

Antígenos de animales domésticos

Un aspecto de la presente invención se refiere a antígenos y/o secuencias antigenicas derivadas de enfermedades o agentes que infectan animales domésticos, especialmente, animales comercialmente relevantes tales como cerdos, vacas, caballos, oveja, cabras, llamas, conejos, visones, ratones, ratas, perros, gatos, hurones, aves de corral tales como pollos, pavos, faisanes y otros, peces tales como trucha, salmón, bacalao y otras especies piscícolas. Los ejemplos de enfermedades o agentes en el presente documento a partir de los cuales se pueden derivar al menos un antígeno o secuencia antigenica incluyen, aunque no de forma limitativa: Enfermedades de múltiples especies tales como: Ántrax, enfermedad de Aujeszky, Lengua azul, Brucelosis tal como: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* o

Brucella suis; Fiebre hemorrágica de Crimea Congo, Equinococosis/hidatidosis, virus de la familia Picornaviridae, género Aphthovirus que produce la enfermedad del pie y la boca, especialmente cualquiera de los siete serotipos inmunológicamente distintos: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1, o cowdriosis, Encefalitis japonesa, Leptospirosis,

- 5 Gusano barrenador del nuevo mundo (*Cochliomyia hominivorax*), Gusano barrenador del viejo mundo (*Chrysomya bezziana*), Paratuberculosis, Fiebre Q, Rabia, Fiebre del valle del Rift, Peste bovina, Triquinelosis, Tularemia, Estomatitis vesicular o Fiebre del Nilo occidental; Enfermedades del ganado tales como: Anaplasmosis bovina, Babesiosis bovina, Campilobacteriosis genital bovina, Encefalopatía espongiforme bovina, Tuberculosis bovina, Diarrea vírica bovina, Pleuroneumonía bovina contagiosa, Leucosis bovina enzoótica, Septicemia hemorrágica, Rinotraqueítis bovina infecciosa / vulvovaginitis pustular infecciosa, Enfermedad de la piel con bultos, Fiebre catarral maligna, Teileriosis, Tricomoniasis o Tripanosomiasis (transmitida por la mosca *tsetsé*); Enfermedades de ovejas y cabras tales como: Artritis /encefalitis caprina, Agalactia contagiosa, Pleuroneumonía caprina contagiosa, Aborto enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina), Maedivisna, Enfermedad de las ovejas de Nairobi, Epididimitis ovina (Brucella ovis), Peste de los pequeños rumiantes, Salmonelosis (*S. abortusovis*), Tembladera, Viruela de las ovejas y viruela de las cabras; Enfermedades equinas tales como: Enfermedad del caballo africano, Metritis equina contagiosa, 10 Durina, Encefalomielitis equina (Oriental), Encefalomielitis equina (Occidental), Anemia infecciosa equina, Gripe equina, Piroplasmosis equina, Rinoneumonitis equina, Arteritis vírica equina, Muermo, Durina (*Trypanosoma evansi*) o encefalomielitis equina venezolana; Enfermedades porcinas tales como: Fiebre porcina africana, Fiebre porcina clásica, Encefalitis del virus Nipah, Cisticercosis porcina, Síndrome reproductivo y respiratorio porcino, Enfermedad vesicular porcina o Gastroenteritis transmisible; Enfermedades de las aves tales como: Clamidiosis aviar, Bronquitis 15 infecciosa aviar, laringotraqueitis infecciosa aviar, Micoplasmosis aviar (*M. gallisepticum*), Micoplasmosis aviar (*M. synoviae*), Virus de la hepatitis del pato, Cólera aviar, Tifus aviar, La gripe aviar muy patógena es cualquiera de los virus de la gripe A o B y especialmente H5N1, Enfermedad bursal infecciosa (Enfermedad de Gumboro), Enfermedad de Marek, Enfermedad de Newcastle, Polorosis o Rinotraqueítis del pavo; Enfermedades de lagomorfos y roedores 20 tales como: Enteritis vírica, Mixomatosis o enfermedad hemorrágica del conejo; Enfermedades de los peces tales como: Necrosis hematopoyética epizoótica, Necrosis hematopoyética infecciosa, Viremia primaveral de la carpa, Virus de la septicemia hemorrágica, Necrosis pancreática infecciosa, Anemia infecciosa del salmón, Síndrome ulceroso epizoótico, Enfermedad renal bacteriana (*Renibacterium salmoninarum*), Girodactilosis (*Gyrodactylus salaris*), Enfermedad iridovírica de la dorada; u otras enfermedades tales como la Viruela del camello o la Leishmaniosis.

30 En una realización preferida de la invención la al menos una proteína o péptido antigénico procede de la enfermedad de Aujeszky, Enfermedad del pie y la boca, Virus de la estomatitis vesicular, Gripe aviar o Enfermedad de Newcastle.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la al menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de dicha proteína o péptido antigénico que es un péptido o proteína antigénica con al menos un 85 % de identidad con cualquiera de los antígenos anteriormente descritos. Se puede calcular la homología o identidad entre aminoácidos mediante cualquiera de las matrices de puntuación BLOSUM anteriormente mencionadas.

35 Antígenos de cáncer

Muchas proteínas/glicoproteínas se han identificado y vinculado a determinados tipos de cáncer; estas se denominan polipéptidos específicos de cáncer, antígenos asociados a tumores o antígenos de cáncer. En general, Se puede usar cualquier antígeno que se encuentra que está asociado con tumores cancerosos. Una manera en la que pueden encontrarse los antígenos específicos de cáncer es mediante los análisis de sustracción tales como diversos análisis 40 de micromatriz, tales como análisis de micromatriz de ADN. En el presente documento, el modelo de expresión génica (como se observa en el nivel del ARN o de la proteína codificada por dichos genes) entre pacientes sanos y cancerosos, se compara entre grupos de pacientes cancerosos o entre tejido sano y canceroso en el mismo paciente. Los genes que tienen niveles de expresión aproximadamente iguales se "sustraen" entre si dejando los genes / 45 productos génicos que difieren entre el tejido sano y canceroso. Esta estrategia es conocida en la técnica y puede utilizarse como un procedimiento para identificar novedosos antígenos cancerosos o para crear un perfil de expresión génica específico de un paciente o grupo de pacientes dado. Los antígenos identificados de esta manera, tanto los antígenos individuales como las combinaciones en las que se pueden haber encontrado se encuentran comprendidos en el ámbito de la presente invención.

50 Preferentemente, el al menos un antígeno de la presente invención se deriva de, aunque no de forma limitativa, un polipéptido específico de cáncer seleccionado entre el grupo de: MAGE-3, MAGE-1, gp100, gp75, TRP-2, tirosinasa, MART-1, CEA, Ras, p53, B-Catenina, gp43, GAGE-1, BAGE-1, PSA, MUC-1, 2, 3, y HSP-70, TRP-1, gp100/pmel17, beta-HCG, mutantes de Ras, mutantes de p53, antígeno del melanoma HMW, MUC-18, HOJ-1, quinasa 4 dependiente de ciclina (Cdk4), Caspasa 8, HER-2/neu, tirosina quinasa Bcr-Abl, antígeno carcinoembriónico (CEA), telomerasa, 55 antígeno Large T de SV40, Virus del papiloma humano VPH de tipo 6, 11, 16, 18, 31 y 33; Oncogén E5 vírico derivado del VPH, E6, E7 y L1; Survivina, Bcl-XL, MCL-1 y Rho-C.

En una realización preferida de la invención, la al menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de una proteína o péptido antigénico es de un polipéptido específico de cáncer seleccionado entre el grupo de: Oncogén E5 vírico derivado del VPH, E6, E7 y L1; Survivina, Bcl-XL, MCL-1 y Rho-C.

Antígeno asociado con una respuesta fisiológica anómala

Una realización de la invención se refiere a una construcción de ácido nucleico, en la que la al menos una proteína o péptido antigenólico o fragmento de una proteína o péptido antigenólico es de un polipéptido asociado con una respuesta fisiológica anómala. Dicha respuesta fisiológica anómala incluye, aunque no de forma limitativa, enfermedades autoinmunitarias, reacciones alérgicas, cánceres y enfermedades congénitas. Una lista no exhaustiva de ejemplos de las mismas incluye enfermedades tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis y enfermedad de Crohn.

Enlazador operativo

Un aspecto de la divulgación se refiere a la construcción de ácido nucleico en la que el enlace operativo entre la cadena invariante y la proteína o péptido antigenólico o el fragmento de la proteína o péptido antigenólico es tanto un enlace directo como un enlace mediado por una región separadora. Por la expresión enlazador operativo se entiende una secuencia de restos de nucleótidos o aminoácidos que unen conjuntamente dos partes de una construcción de ácido nucleico o polipéptido químérico de manera que aseguran el procesamiento biológico del ácido nucleico o polipéptido. Si el enlazador operativo es un enlace directo, los dos ácidos nucleicos que codifican cada uno tanto un

- 10 marco de lectura abierto como un fragmento de un marco de lectura abierto se colocan inmediatamente adyacentes entre sí y por tanto también en marco. Si el enlazador operativo está mediado por una región separadora, se insertan una serie de nucleótidos entre los nucleótidos que codifican la al menos una cadena invariante y el al menos un péptido antigenólico, respectivamente. Está comprendido en el ámbito de la presente invención tener una región separadora en la que la región separadora es meramente una serie de nucleótidos que unen los al menos dos elementos de la
- 15 presente invención de una manera que retienen los marcos de lectura abiertos, o la región separadora puede codificar una o más señales o elementos separados como se define en el presente documento a continuación.
- 20

En una realización concreta, la invención comprende un enlazador operativo, en el que el enlazador operativo es una región separadora.

En una realización, la invención comprende una región separadora que codifica al menos un epítopo auxiliar para las moléculas MHC de clase II. Un ejemplo de un epítopo auxiliar es un determinante inmunógeno tal como la toxina de la difteria. Especialmente la región del extremo COOH del fragmento B de la toxina de la difteria ha mostrado ser inmunógena en ratones. Además, HSP70, en parte o en todo, así como otros péptidos inmunógenos, tales como el virus de la gripe o las secuencias o péptidos inmunógenos con un motivo de anclaje a las moléculas HLA de clase I y clase II, también puede estar codificado en la región separadora de la construcción de ácido nucleico.

- 25
- 30 En otra realización, la región separadora de la construcción de ácido nucleico codifica al menos un sitio de escisión de la proteasa. Los sitios de escisión de las proteasas lisosómicas tales como catepsinas, aspartato proteasas y cinc proteasas así como otras proteasas intracelulares se encuentran comprendidas en el ámbito de la presente invención.

En una realización más, el enlazador operativo de la construcción de ácido nucleico puede comprender al menos una secuencia que codifica el ARNip o el miARN. ARNip (los ARN interferentes pequeños) y miARN (los microARN), los ARN endógenos diana, de una manera específica de secuencia, para la degradación. Un ARNip o un miARN codificados con la construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden por tanto seleccionarse para dirigirse a un producto genético indeseable.

- 35
- 40
- 45 En otra realización, el enlazador operativo comprende al menos un polienlazador o un sitio de clonación múltiple (MSC). Los polienlazadores y los MSC son series de nucleótidos que comprenden secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción, es decir, sitios donde una enzima de restricción corta en ADN de una manera enromada o escalonada facilitando la subclonación de otros fragmentos / secuencias de ADN en la construcción de ácido nucleico. Las secuencias de reconocimiento de los polienlazadores / MSC son normalmente únicas, lo que significa que no se encuentran en otra parte de la construcción de ácido nucleico. El enlazador operativo puede comprender además uno o más codones de detención o terminación que señalan la liberación del polipéptido nascente desde el ribosoma. El enlazador operativo puede comprender también al menos un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) y / o al menos un promotor. Un IRES es una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción en la parte intermedia de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) como parte del proceso más grande de la síntesis de proteínas. Un promotor es una secuencia de ADN que permite a un gen transcribirse. El promotor es reconocido por la ARN polimerasa, que inicia a continuación la transcripción, véase a continuación. El promotor puede ser sencillo o bidireccional.

- 50
- 55 En una realización de la divulgación, el enlazador operativo que abarca la región entre la cadena invariante y el al menos un antígeno es un enlazador operativo que comprende al menos un polienlazador, y al menos un promotor, y opcionalmente, también al menos un IRES. Estos elementos pueden colocarse en cualquier orden. En una realización preferida adicional de la divulgación, El codón de detención de la cadena invariante se ha eliminado, y el polienlazador se ha clonado en el vector de una manera que conserva el marco de lectura abierto que permite que se inserte el marco de lectura del al menos un antígeno en el polienlazador. Esto tiene la ventaja de facilitar la subclonación de múltiples antígenos en la misma construcción en una etapa o en múltiples etapas de clonación y que permite la expresión simultánea de múltiples antígenos en el mismo marco que la cadena invariante. Se puede insertar un codón de detención después del polienlazador para la terminación de la traducción. Esta realización de la divulgación puede combinarse con cualquiera de los epítopos auxiliares anteriores, los mi/ARNip de cualquiera de los otros elementos

descritos en el presente documento.

Una realización de la divulgación se refiere a la colocación del enlazador operativo en relaciones con la al menos una cadena invariante y la al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento de dicha proteína o péptido, en el que el al menos un péptido antigénico que codifica las secuencias se coloca: dentro de la secuencia de la cadena invariante, en el extremo frontal de la secuencia de la cadena invariante, en la parte terminal de la secuencia de la cadena invariante. Esto se lleva a cabo de una manera que asegura la capacidad de lectura del marco de lectura abierto de la construcción, de tal manera que el péptido antigénico está: precedido, rodeado, o rematado por, al menos un enlazador operativo.

Otra realización de la divulgación se refiere además a la colocación del enlazador operativo en relaciones con el al menos una cadena invariante y el al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento de dicha proteína o péptido, En el que el al menos un péptido antigénico que codifica una secuencia se coloca preferentemente en la parte terminal de la cadena invariante y un enlazador operativo se inserta en el presente documento entre: la parte terminal, que es el primer o el último resto de la cadena invariante o fragmento de la misma.

En otra realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico no comprende un enlazador operativo; en su lugar, el al menos un péptido antigénico que codifica una secuencia se ancla directamente a la cadena invariante. El al menos un péptido antigénico que codifica las secuencias puede colocarse: dentro de la secuencia de la cadena invariante, en el extremo frontal de la secuencia de la cadena invariante, en la parte terminal de la secuencia de la cadena invariante. Esto se lleva a cabo de una manera que asegura la capacidad de lectura del marco de lectura abierto de la construcción,

Existen ventajas para ambas posibilidades de incluir o excluir un enlazador operativo; excluir el enlazador puede, en una realización de la divulgación, reducir la posibilidad de cebar una respuesta inmunitaria contra dicho enlazador más bien que cebar una respuesta inmunitaria contra el péptido antigénico.

Combinaciones

Está comprendido en el ámbito de la presente invención que la construcción de ácido nucleico codifica una pluralidad de elementos. Los elementos son la variante de una cadena invariante y la al menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de dicha proteína o péptido. Se encuentra comprendido por tanto en el ámbito de la presente invención tener una pluralidad de variantes de una cadena invariante de estas que están unidas operativamente entre sí y a una pluralidad de proteínas o péptido antigenicos o fragmentos de proteínas o péptido antigenicos, en el que estos están unidos operativamente. Los elementos de la construcción de ácido nucleico deben por tanto estar unidos operativamente entre sí. Algunas series de variantes de la cadena invariante están unidas cada una de manera operativa a una proteína o péptido antigénico o un fragmento de dicha proteína o péptido, cada una de estas series que están unidas operativamente entre sí están abarcadas en la presente invención.

Las ventajas y aspectos muy importantes de la presente invención se refieren al hecho de que pueden iniciarse cualquier tipo de respuesta inmunitaria, por ejemplo, respuestas mediadas por linfocitos T y anticuerpos, ambas con epítopos conocidos por ser antígenos débiles, con polipéptidos de propiedades antigenicas desconocidas, y con múltiples epítopos/antígenos simultáneamente.

Está comprendido también por tanto en el ámbito de la divulgación que una realización preferida es una construcción de ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante o una variante de la misma unida operativamente a una pluralidad de proteínas o péptidos antigenicos o fragmentos de proteínas o péptidos, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce o más proteínas o péptidos antigenicos o fragmentos de proteínas o péptidos.

La construcción de ácido nucleico puede comprender elementos adicionales. Estos incluyen, aunque no de forma limitativa: sitios internos de entrada a ribosoma (IRES); genes que codifican proteínas relacionadas con la presentación de un antígeno tal como LAMP, calreticulina, Hsp 33, Hsp 60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, sHSP (proteína pequeña de choque térmico) y proteínas de unión de choque térmico tales como el dominio de unión a Hsp73 homólogo al ADNJ del resto 77; los genes que codifican proteínas que están relacionadas con la diseminación intracelular tales como VP22, HIV Tat, Cx43 u otras conexinas y los constituyentes y los constituyentes intercelulares de unión a gap; los genes que codifican moléculas de activación de linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK) tales como H60 y citoquinas, ovoalbúmina de pollo o cualquier epítopo de linfocito T auxiliar.

En una realización preferida de la presente invención, la construcción de ácido nucleico comprende al menos un gen que codifica una proteína relacionada con una presentación de antígenos tal como LAMP, LIMP, calreticulina Hsp 33, Hsp 60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, sHSP (proteína pequeña de choque térmico) o el dominio de unión a Hsp73 homólogo al ADNJ del resto 77.

En una realización más preferida de la presente invención, la construcción de ácido nucleico comprende al menos un gen que codifica una proteína relacionada con la diseminación intracelular tal como VP22, Cx43, HIV Tat, otras conexinas o los constituyentes intercelulares de unión a gap.

Promotor

El término promotor se utilizará aquí para referirse a un grupo de módulos de control de la transcripción que se agrupan alrededor del sitio de inicio de la ARN polimerasa II. Mucho de lo que se piensa acerca de como se organizan los promotores deriva de los análisis de algunos promotores víricos, incluyendo aquellos para la timidina quinasa (tk) del VHS y unidades de transcripción temprana del SV40. Estos estudios, aumentados por trabajos más recientes, han

- 5 mostrado qué promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, consistiendo cada uno en aproximadamente 7-20 pb de ADN, y conteniendo uno o más sitios de reconocimiento de proteínas activadoras de la transcripción. Al menos un módulo en cada promotor funciona para situarse en el sitio de inicio de la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la secuencia TATA, pero en algunos promotores, la carencia de una secuencia TATA, tal como el promotor del gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor de los genes tardíos del SV40, un elemento discreto superpuesto al propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de inicio.

10 Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, Estos se localizan en la región de 30-110 pb en la dirección 5' del sitio de inicio, aunque numerosos promotores han mostrado recientemente contener también elementos funcionales en la dirección 3' del sitio de inicio. La separación entre los elementos es flexible, de tal manera que se preserva la función del promotor cuando los elementos se invierten o 15 mueven en relación unos con otros. En el promotor tk, la separación entre los elementos puede aumentarse a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar tanto de forma cooperativa como independiente para activar la transcripción. Cualquier promotor que pueda dirigir el inicio de la transcripción de las secuencias codificadas por la construcción de ácido nucleico puede utilizarse en la invención.

- 20 Un aspecto de la divulgación comprende la construcción de ácido nucleico en la que al menos una cadena invariante unida operativamente y la proteína o el péptido antigénico que codifica la secuencia está precedido por un promotor que permite la expresión de la construcción.

25 Es un aspecto adicional de la divulgación que el promotor se selecciona entre el grupo de promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos de organismos, promotores específicos de tejidos, promotores específicos de tipos de células y promotores específicos de la inflamación.

30 Los ejemplos de promotores incluyen, aunque no de forma limitativa: promotores constitutivos tales como: promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), un promotor de virus del tumor mamario del ratón, un promotor de la repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana, un promotor del virus Moloney, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR), un promotor de la actina humana, un promotor de la miosina humana, un promotor de la hemoglobina humana, el promotor de citomegalovirus (CMV) y un promotor de la creatina muscular humana, promotores inducibles tales como: un promotor de la metalotionina, un promotor glucocorticoideo, un promotor de progesterona, y un promotor de tetraciclina (tet-on o tet-off), promotores específicos de tejidos tales como: un promotor de HER-2 y un promotor asociado a PSA y promotores bidireccionales, que son capaces de iniciar la transcripción en cualquier dirección desde el promotor.

35 Las ventajas de usar un promotor inducible incluyen la opción de proporcionar una construcción de ácido nucleico "durmiente" que puede activarse a voluntad. Esto puede ser de uso en el cebado de una respuesta inmunitaria que se induce solo preferentemente de forma local frente a sistémica en un cuerpo (por ejemplo, en los casos que implican cáncer, o el cebado de una respuesta inmunitaria es perjudicial para la salud del receptor en el momento de la administración.

40 En una realización preferida, la construcción de ácido nucleico comprende un promotor seleccionado entre el grupo del: promotor de CMV, promotor del SV40 y promotor del VSR.

Vehículo de administración

45 Un aspecto de la presente invención comprende la construcción de ácido nucleico que se describe en cualquiera de los anteriores, comprendida en un vehículo de administración. un vehículo de administración es una entidad por la cual una secuencia de nucleótidos o polipéptido o ambos se puede transportar desde al menos un medio a otro. Los vehículos de administración se usan generalmente para la expresión de las secuencias codificadas en la construcción de ácido nucleico y/o para la administración intracelular de la construcción o el polipéptido codificado de la anterior.

50 La construcción de ácido nucleico puede transferirse en células *in vivo* o *ex vivo*; lo último, eliminando el tejido diana (es decir, hepatocitos o glóbulos blancos) del paciente, transfiriendo la construcción *in vitro* y a continuación reimplantando las células transducidas en el paciente.

Los procedimientos de administración no vírica incluyen estrategias físicas (administración exenta de transportador) y químicas (administración basada en vectores sintéticos).

55 Las estrategias físicas, incluyendo la inyección con aguja, pistola génica, inyección por chorro, electroporación, ultrasonidos, y administración hidrodinámica, emplean una fuerza física que permea la membrana celular y facilita la transferencia génica intracelular. Dicha fuerza física puede ser eléctrica o mecánica.

Las estrategias químicas utilizan compuestos de origen sintético o natural como transportadores para administrar el transgén en las células. La estrategia estudiada más frecuentemente para la administración de genes no víricos es la formulación de ADN en partículas condensadas utilizando lípidos catiónicos o polímeros catiónicos. Las partículas que contienen ADN son capturadas por las células posteriormente mediante endocitosis, macropinocitosis, o fagocitosis en la forma de vesículas intracelulares, a partir de las cuales se libera una pequeña fracción del ADN en el citoplasma y migra al núcleo, donde tiene lugar la expresión del transgén.

Está comprendido en el ámbito de la presente invención que el vehículo de administración es un vehículo seleccionado entre el grupo de: vehículos basados en ARN, vehículos / vectores basados en ADN, vehículos basados en lípidos, vehículos basados en polímeros y vehículos de ADN o ARN derivados víricamente.

10 Una realización preferida de la divulgación se refiere a la administración de la construcción de ácido nucleico mediante técnicas mecánicas o eléctricas.

- Estrategias físicas

15 ◦ Inyección: Una realización preferida de la divulgación se refiere a la inyección simple de la construcción de ácido nucleico en solución. La inyección se lleva a cabo normalmente por vía intramuscular (IM) en el músculo esquelético, por vía intradérmica (ID) o en el hígado, administrándose la construcción de ácido nucleico a los espacios extracelulares. La administración mediante inyección puede ser ayudada mediante electroporación;

20 ◦ usando soluciones hipertónicas de solución salina o sacarosa; dañando temporalmente las fibras musculares con miotoxinas tales como bupivacaína; o añadiendo sustancias capaces de potenciar la eficacia de internalización del ADN en células diana tal como mediante transferrina, disolventes inmiscibles en agua, polímeros no iónicos, tensioactivos o inhibidores de la nucleasa.

25 ◦ Pistola génica: La pistola génica o el Sistema Biolítico de Administración de Partículas es un dispositivo para inyectar células con información genética. La carga útil es una partícula elemental de un metal pesado tal como oro, plata o wolframio revestido con por ejemplo, ADN plásmido. Esta técnica se denomina a menudo simplemente biolítica. Se puede usar helio comprimido como propulsor. Especialmente el revestimiento de la construcción de ácido nucleico tras las partículas de oro, tal como las partículas de oro coloidal, es una realización favorecida.

30 ◦ inyección neumática (por chorro): La solución acuosa no requiere partículas ◦ Electroporación, o electroporabilización, es un aumento significativo en la conductividad y permeabilidad eléctrica de la membrana plasmática de la célula producida por un campo eléctrico aplicado externamente.

35 ◦ Transferencia génica facilitada por ultrasonidos: los ultrasonidos crean poros en la membrana y facilitan la transferencia génica intracelular mediante la difusión positiva de ADN a través de los poros de la membrana. Puede potenciarse la eficacia mediante el uso de agentes o condicione de contraste que hacen a las membranas más fluidas.

40 ◦ Administración génica hidrodinámica: La administración génica hidrodinámica es un procedimiento sencillo que introduce ADN plásmido puro en células en órganos internos muy perfundidos (por ejemplo, el hígado). En roedores, una inyección rápida en la vena de la cola de un gran volumen de solución de ADN produce un exceso transitorio de la solución inyectada en la vena cava inferior que excede el gasto cardíaco. Como resultado, la inyección induce un flujo retrógrado de solución de ADN en el hígado, un rápido aumento de la presión intrahepática, la expansión del hígado, y una alteración reversible de las ventanas del hígado.

40 • Estrategias químicas

45 ◦ Administración génica mediada por lípidos catiónicos: Aunque algunos lípidos catiónicos presentan solo buena actividad de transfección, a menudo se formulan con un fosfolípido o colesterol no cargado como el lípido auxiliar para formar liposomas. Tras la mezcla con liposomas catiónicos, El ADN plásmido se condensa en partículas pequeñas casi estables denominadas lipoplexos. El ADN en los lipoplexos está bien protegido de la degradación de la nucleasa. Los lipoplexos son capaces de estimular la captación celular y facilitan la liberación del ADN de las vesículas intracelulares antes de alcanzar los compartimentos lisosómicos destructivos.

50 ◦ Transferencia génica mediada por polímeros catiónicos: La mayoría de polímeros catiónicos comparten la función de condensar el ADN en partículas pequeñas y facilitar la captación celular mediante endocitosis a través de la interacción carga-carga con sitios aniónicos sobre las superficies celulares. Los transportadores de ADN de polímeros catiónicos incluyen polietilenimina (PEI), dendrímeros de poliamidoamina y polipropilamina, polialilamina, dextrano catiónico, quitosán, proteínas catiónicas (polilisina, protamina, e histonas), y péptidos catiónicos.

55 ◦ Sistema híbrido lípido-polímero: ADN precondensado con policationes, revestido a continuación con cualquiera de liposomas catiónicos, liposomas aniónicos, o polímeros anfifílicos con o sin lípidos auxiliares.

Los ejemplos de vehículos de administración química incluyen, aunque no de forma limitativa: microesferas de polímeros biodegradables, formulaciones basadas en lípidos tales como transportadores de liposomas, moléculas cargadas catiónicamente tales como liposomas, sales de calcio o dendrímeros, lipopolisacáridos, polipéptidos y polisacáridos.

Los procedimientos de administración física alternativos pueden incluir la instilación mediante aerosol de una

construcción de ácido nucleico pura sobre las superficies mucosales, tal como la mucosa nasal y pulmonar; administración tópica de la construcción de ácido nucleico al ojo y a los tejidos mucosales; e hidratación tal como la hidratación del estroma, por la cual se fuerza a la solución salina en el estroma de la córnea del ojo.

- 5 Otra realización de la presente invención comprende un vector que en el presente documento que en el presente documento es denotado como un vector vírico (es decir no un virus) como un vehículo de administración. Los vectores víricos de acuerdo con la presente invención se preparan a partir de un genoma vírico modificado, es decir el ADN o ARN actual formador del genoma vírico, e introducido en forma pura. Por tanto, Cualesquiera estructuras revestidas que rodean el genoma vírico realizadas de proteínas víricas o no víricas no son parte del vector vírico de acuerdo con la presente invención.
- 10 El virus a partir del cual se deriva el vector vírico se selecciona a partir del grupo no exhaustivo de: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus vaccinia, espumavirus, citomegalovirus, virus del bosque Semliki, poxvirus, vector vírico de ARN y vector vírico de ADN. Dichos vectores víricos son bien conocidos en la técnica.

Células recombinantes

- 15 Un aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende la construcción de ácido nucleico que se define en cualquiera de los anteriores. Dicha célula recombinante se puede usar como una herramienta para la investigación *in vitro*, como un vehículo de administración para la construcción de ácido nucleico o como parte de un régimen de terapia génica. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede introducirse en las células mediante técnicas bien conocidas en la materia y que incluyen la microinyección de ADN en el núcleo de una célula, transfección, electroporación, lipofección/fusión de liposomas y bombardeo de partículas. Las células adecuadas incluyen células autólogas y no autólogas, y pueden incluir células xenogénicas.

- 20 En una realización preferida, la construcción de ácido nucleico de la presente invención está comprendida en una célula presentadora de antígenos (APC). Cualquier célula que presenta antígenos sobre su superficie en asociación con una molécula de MHC se considera una célula presentadora de antígenos. Dichas células incluyen, aunque no de forma limitativa, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, APC híbridas, y APC potenciadas. Los procedimientos para preparar APC híbridas son bien conocidos en la materia.

25 En una realización más preferida, la APC es una célula presentadora de antígenos profesional y lo más preferible, la APC es una célula que expresa MHC-I y/o MHC-II.

- 30 La APC de acuerdo con cualquiera de las anteriores puede ser un citoblasto obtenido de un paciente. Tras introducir la construcción de ácido nucleico de la invención, el citoblasto puede reintroducirse en el paciente en un intento de tratar el paciente de una dolencia médica. Preferentemente, la célula aislada del paciente es un citoblasto capaz de diferenciarse en una célula presentadora de antígenos.

- 35 Se incluye además en el ámbito de la presente invención que la célula presentadora de antígenos que comprende la construcción de ácido nucleico de la presente invención no expresa ninguna señal coestimuladora y la proteína o péptido antigénico o el fragmento antigénico de dicha proteína o péptido es un autoantígeno.

Proteínas químéricas y anticuerpos

- 40 Un objeto de la divulgación es la proteína químérica codificada por las construcciones de ácido nucleico que se han descrito en el presente documento anteriormente, que comprenden al menos una cadena invariante unida operativamente o las variantes de la misma y al menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de dicha proteína o péptido antigénico. Por proteína químérica se entiende una proteína diseñada mediante ingeniería genética que está codificada por una secuencia de nucleótidos preparada mediante corte y empalme de dos o más genes completos o parciales o una serie de ácidos nucleicos (no) aleatorios.

- 45 Un aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo que puede reconocer la proteína químérica que se ha definido en el presente documento anteriormente. Por el término anticuerpo se entiende moléculas de inmunoglobulina y porciones activas de las moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos son por ejemplo moléculas de inmunoglobulina intactas o fragmentos de las mismas que retienen la actividad inmunológica. Se pueden usar dichos anticuerpos para la inmunización pasiva de un animal, o para su uso en un ensayo para detectar proteínas a las cuales el anticuerpo se une.

Composiciones de construcciones de ácido nucleico

- 50 Un aspecto de la divulgación se refiere a una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante o las variantes de la misma unidas operativamente a al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido. La composición de la divulgación puede comprender por tanto una construcción de ácido nucleico como se define en cualquiera de los anteriores. La composición de la divulgación puede además utilizarse como un medicamento.

la composición de la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos tales como mediante la premezcla de uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, conocidos también como excipientes o estabilizantes con el principio activo. Estos excipientes pueden ser aceptables para la administración de cualquier individuo / animal, preferentemente a vertebrados, y más preferentemente a seres humanos ya que no son tóxicos para la célula o el individuo que está expuesto al anterior y a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el transportador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Se pueden encontrar ejemplos de dichos excipientes, transportadores y procedimientos de formulación por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton, PA). Los ejemplos de transportadores fisiológicamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Para formular una composición farmacéuticamente aceptable para la administración eficaz, Dichas composiciones contendrán de acuerdo con la divulgación una cantidad eficaz de la construcción de ácido nucleico, la construcción de ácido nucleico comprendida en un vehículo de administración o la proteína químérica codificada en la construcción de ácido nucleico que se ha descrito en el presente documento. A menudo, si el cebado de la respuesta inmunitaria con proteínas o polipéptidos está codificado por la construcción de ácido nucleico de la divulgación, se usará un transportador como estructura principal acoplando las proteínas o péptidos al mismo y ayudando por tanto en la inducción de una respuesta inmunitaria. La proteína transportadora puede ser cualquier transportador convencional incluyendo cualquier proteína adecuada para presentar determinantes inmunógenos. Los transportadores adecuados son normalmente grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotículas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivas. Dichos transportadores son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia. Adicionalmente, estos transportadores pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). La inmunización del animal puede llevarse a cabo con adyuvantes y/o transportadores farmacéuticos. Las proteínas transportadoras convencionales incluyen, aunque no de forma limitativa, hemocianina de lapa californiana, proteínas séricas tales como transferrina, albúmina de suero de bovino, o albúmina de suero humana, una ovoalbúmina, inmunoglobulinas, u hormonas, tales como insulina. El transportador puede estar presente junto con un adyuvante o independientemente del anterior.

En la siguiente divulgación, la composición de la construcción de ácido nucleico o la composición se entiende que abarca composiciones útiles para el uso profiláctico y terapéutico, incluyendo estimular una respuesta inmunitaria en un paciente. Se contempla además que la composición de la divulgación no induce ninguna reacción de toxicidad sistémica o local o cualquier otro efecto secundario.

En una realización preferida de la divulgación, la frase 'composición' como se usa en el presente documento se refiere a una composición para cebar una respuesta inmunitaria.

En una realización preferida, la construcción de ácido nucleico se empaqueta. El paquete significa que la construcción de ácido nucleico incluye medios seleccionados entre, aunque no de forma limitativa el grupo de: vectores basados en ARN o vectores basados en ADN, transportadores basados en lípidos, vectores de expresión vírica, vectores de administración vírica, revestimiento de partículas de oro coloidales y microesferas de polímeros biodegradables. Cualquiera de los medios de administración anteriormente mencionados puede por tanto utilizarse a fines de empaquetado para su uso en una composición.

En una realización, el empaquetado significa que la construcción de ácido nucleico es un vector de expresión vírica seleccionado entre, aunque no de forma limitativa el grupo de: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus vaccinia y un vector vírico de ADN. El vector vírico puede ser un vector vírico deficiente en la replicación o deficiente en la replicación de forma condicional.

Un aspecto de la divulgación se refiere a una composición que comprende al menos dos vectores. Esto abarca que una cualquiera o dos diferentes construcciones de ácido nucleico como se ha descrito pueden empaquetarse en al menos dos vectores, estos vectores son de un tipo como se describe en cualquiera de lo anterior. La divulgación se refiere además a una composición que comprende tres, cuatro, cinco o seis vectores. De nuevo, Estos vectores pueden diferir entre sí o no, y pueden transportar construcciones de ácido nucleico idénticas o diferentes como se ha descrito en el presente documento anteriormente. Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a una composición que comprende al menos una proteína químérica como la codificada por cualquiera de las construcciones de ácido nucleico descritas en el presente documento. cuando una proteína o polipéptido químérico se va a usar como un inmunógeno, puede producirse mediante la expresión de una cualquiera o más de las construcciones de ácido nucleico descritas anteriormente en una célula recombinante o puede prepararse mediante síntesis química por procedimientos conocidos en la técnica. Como se describió anteriormente, dichas proteínas y / o péptidos químéricos pueden acoplarse a transportadores para aumentar la respuesta inmunológica a las proteínas / péptidos y puede administrarse

con o sin un adyuvante y/o excipiente.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de la construcción de ácido nucleico como se describe en el presente documento para la producción de una composición.

Potenciación de una respuesta inmunitaria: Adyuvantes tradicionales

5 Se pueden incluir adyuvantes en la composición desvelada para potenciar la respuesta inmunitaria específica. Por tanto, es particularmente importante identificar un adyuvante que cuando se combina con el(s) antígeno(s) / construcciones de ácido nucleico y / o vehículos de administración (cualquiera de los cuales puede también denominarse determinante inmunógeno), da como resultado una composición capaz de inducir una respuesta inmunológica específica fuerte. El determinante inmunógeno puede también mezclarse con dos o más adyuvantes diferentes antes de la inmunización. Las composiciones se denominan también composiciones inmunógenas en el

10 presente texto.

Se han descrito y utilizado un gran número de adyuvantes para la generación de anticuerpos en animales de laboratorio, tales como ratones, ratas y conejos. En dicho escenario, la tolerancia del efecto secundario es más bien alta, con el objetivo principal de obtener una respuesta de anticuerpos intensa. para su uso y para la homologación 15 para su uso en productos farmacéuticos, y especialmente para su uso en seres humanos se requiere que los componentes de la composición, incluyendo el adyuvante, estén bien caracterizados. Se requiere además que la composición tenga un riesgo mínimo de cualquier reacción adversa, tal como granuloma, abscesos o fiebre.

Una realización de la divulgación se refiere a una composición que comprende un adyuvante. En una realización preferida de la divulgación, la composición es adecuada para la administración a un mamífero, tal como un ser humano. 20 Por tanto, el adyuvante preferido es adecuado para la administración a un mamífero y lo más preferible para la administración a un ser humano.

En otra realización preferida de la divulgación, la composición es adecuada para la administración a un pájaro o a un pez, y lo más preferible a un pollo (*Gallus gallus domesticus*). Por tanto, el adyuvante preferido es adecuado para la administración a un pájaro o a un pez.

25 La elección del adyuvante puede seleccionarse además por su capacidad de estimular el tipo de respuesta inmunitaria deseada. La activación de los linfocitos B y/o los linfocitos T y la composición puede formularse para optimizar la distribución y presentación de los tejidos linfáticos relevantes.

Los adyuvantes pertenecientes a la divulgación pueden agruparse de acuerdo con su origen, sea este mineral, bacteriano, vegetal, sintético, o producto del hospedador. El primer grupo bajo esta clasificación es el de los adyuvantes minerales, tales como compuestos de aluminio. Los antígenos precipitados con sales de aluminio o 30 antígenos mezclados con o adsorbidos en compuestos de aluminio realizados se han usado extensamente para aumentar las respuestas inmunitarias en animales y seres humanos. Se ha demostrado que hay partículas de aluminio en los ganglios linfáticos regionales de conejos siete días después de la inmunización, y puede ser que otra función significativa sea dirigir el antígeno a las áreas que contienen los linfocitos T en los ganglios por sí mismos. Se ha 35 demostrado que la potencia adyuvante se correlaciona con la insinuación de los ganglios linfáticos drenantes. Mientras que muchos estudios han confirmado que los antígenos administrados con sales de aluminio conducen a una inmunidad humoral aumentada, la inmunidad mediada por célula parece estar solo ligeramente aumentada, como se midió por la hipersensibilidad de tipo retrasados. Se ha descrito también el hidróxido de aluminio como activador de la ruta del complemento. Este mecanismo puede jugar un papel en la respuesta inflamatoria local así como en la 40 producción de inmunoglobulina y la memoria de los linfocitos B. Además, el hidróxido de aluminio puede proteger el antígeno de un catabolismo rápido. Debido principalmente a su excelente registro de seguridad, los compuestos de aluminio son actualmente los únicos adyuvantes usados en seres humanos.

Otro gran grupo de adyuvantes es el de aquellos de origen bacteriano. Los adyuvantes con orígenes bacterianos 45 pueden purificarse y sintetizarse (por ejemplo, dipéptidos de muramilo, lípido A) y se han clonado mediadores de los hospedadores (Interleuquina 1 y 2). La última década ha producido un significativo progreso en la purificación química de varios adyuvantes de componentes activos de origen bacteriano: *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos, Adyuvante de Freund completo y adyuvante de Freund incompleto (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) y Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ). Los adyuvantes adicionalmente adecuados de acuerdo con la divulgación son, por ejemplo, Adyuvante clásico Titermax (SIGMA-ALDRICH), ISCOMS, Quil A, 50 ALUN, véanse documentos US 58767 y 5.554.372, derivados del lípido A, derivados de la toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices de péptidos sintéticos, GMDP, y otros, así como combinados con inmunoestimulantes (documento US 5.876.735). B. pertussis es de interés como un adyuvante en el contextos de la presente invención debido a su capacidad de modular la inmunidad mediada por células mediante la acción sobre las poblaciones de linfocitos T. Para lipopolisacáridos y el adyuvante de Freund completo, se han identificado y sintetizado 55 restos activos de adyuvante que permiten estudiar las relaciones de estructura-función. Se consideran estos también para la inclusión en composiciones inmunógenas de acuerdo con la divulgación.

Se ha encontrado que los lipopolisacáridos (LPS) y sus diversos derivados, incluyendo el lípido A, son poderosos adyuvantes en combinación con liposomas u otras emulsiones lipídicas. No se ha determinado aún si se pueden

producir derivados con suficientemente baja toxicidad para uso general en seres humanos. El adyuvante de Freund completo es el patrón en la mayoría de estudios experimentales.

Se puede añadir aceite mineral a la composición inmunógena a fin de proteger el antígeno del catabolismo rápido.

5 Se pueden usar otros muchos tipos de materiales como adyuvantes en composiciones inmunógenas de acuerdo con la divulgación. Incluyen productos vegetales tales como saponinas, productos animales tales como quitina y numerosos productos químicos sintéticos.

10 Los adyuvantes de acuerdo con la divulgación pueden también clasificarse por sus mecanismos de acción propuestos. Este tipo de clasificación es necesariamente algo arbitraria debido a que la mayoría de adyuvantes parece funcionar por más de un mecanismo. Los adyuvantes pueden actuar mediante la localización y administración del antígeno, o mediante efectos directos sobre las células preparando el sistema inmunitario, tal como macrófagos y linfocitos. otro mecanismo por el cual los adyuvantes de acuerdo con la divulgación potencian la respuesta inmunitaria es mediante la creación de un depósito de antígeno. Esto parece contribuir con la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio, emulsiones de aceite, liposomas, y polímeros sintéticos. La actividad adyuvante de los lipopolisacáridos y los dipéptidos de muramilo parece estar mediada principalmente por la activación de los macrófagos, mientras que N. pertussis afecta a macrófagos y linfocitos. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden ser útiles cuando se incorporan en composiciones inmunógenas de acuerdo con la divulgación se describen en el documento US 5.554.372.

20 Los adyuvantes útiles en las composiciones de acuerdo con la divulgación pueden por tanto ser sales minerales, tales como hidróxido de aluminio y aluminio o geles de fosfatos de calcio, emulsiones oleosas y formulaciones basadas en tensioactivos tales como MF59 (emulsión de aceite en agua estabilizada con detergente microfluidizado), QS21 (saponina purificada), AS02 (SBAS2, emulsión de aceite en agua + monofosforil lípido A (MPL) + QS21), Montanida ISA 51 e ISA-720 (emulsión de agua en aceite estabilizada), Adyuvante 65 (que contiene aceite de cacahuete, monooleato de manida y monoestearato de aluminio), RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Utah), adyuvantes particulados, tales como virosomas (vehículos liposómicos unilamelares que incorporan hemaglutinina de la gripe), 25 AS04 (sal de Al con MPL), ISCOMS (complejo estructurado de saponinas y lípidos (tales como colesterol), poliláctido co-glicólido (PLG), derivados microbianos (naturales y sintéticos) tales como monofosforil lípido A (MPL), Detox (MPL + *M. Phlei* esqueleto de la pared celular), AGP (RC-529 (monosacárido acilado sintético)), DC_chol (inmunoestimuladores lipoidales capaces de autoorganizarse en liposomas), OM-174 (derivado de lípido A), motivos Cpg (oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG inmunoestimuladores, las toxinas bacterianas modificadas, LT y CT, sin efectos tóxicos adyuvantes, Inmunomoduladores humanos endógenos, por ejemplo, hGM-CSF o hIL-12 o Immudaptin (matriz C3d en tandem), vehículos inertes tales como partículas de oro.

30

35 Los ejemplos adicionales de adyuvantes comprenden: Emulsiones oleosas inmunoestimuladoras (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua tal como por ejemplo, adyuvante de Freund incompleto tal como Montainde®, Specol, sales minerales tales como, por ejemplo, Al(OH)₃, AlPO₄, productos microbianos, Saponinas tales como Qual A, productos sintéticos, así como formulaciones adyuvantes, y complejos inmunoestimuladores (ISCOM) y citoquinas, bacterias/componentes inactivados térmicamente, nanoperlas, LPS, LTA. Se desvela una lista de otros adyuvantes comúnmente utilizados en las páginas 6-8 del documento WO 2003/089471.

40 Las composiciones inmunógenas de acuerdo con la divulgación pueden contener también diluyentes tales como tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Una solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero no específica son diluyentes ilustrativos adecuados.

45 Los adyuvantes se incluyen generalmente en las composiciones inmunógenas en una cantidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Potenciación de una respuesta inmunitaria: Adyuvantes no tradicionales

Modulación de las citoquinas

50 Para que una vacuna sea eficaz, esta debe inducir una respuesta inmunitaria adecuada para un patógeno dado. Esto puede llevarse a cabo mediante modificaciones de la forma del antígeno expresada (es decir, intracelular frente a secretada), el procedimiento y la ruta de administración, y la dosis de ADN administrada. Sin embargo, puede también llevarse a cabo mediante la administración simultánea de ADN plásmido (ADNp) que codifica moléculas inmunorreguladoras, por ejemplo, citoquinas, linfoquinas o moléculas coestimuladoras. Estos "adyuvantes genéticos", junto con cualquiera de los 'adyuvantes tradicionales' u 'otros adyuvantes inmunoestimuladores' que se reseñan en el presente documento, pueden administrarse de numerosas maneras:

- 55 • como una mezcla de 2 plásmidos separados, codificando uno el inmunógeno y codificando el otro la citoquina;
- como un único vector bicistrónico o policistrónico, separado por regiones separadoras; o
- como una quimera codificada por un plásmido, o proteína de fusión; o
- en su forma nativa, es decir, una proteína o nucleótido.

En general, la administración simultánea de agentes proinflamatorios (tales como diversas interleuquinas, factor de necrosis tumoral, y GM-CSF) más citoquinas inductoras de TH2 aumenta las respuestas del anticuerpo, mientras que los agentes proinflamatorios y las citoquinas inductoras de TH1 disminuyen las respuestas humorales y aumentan las respuestas citotóxicas (que son más importantes, por ejemplo, en la protección vírica). Se usan también algunas veces moléculas similares a B7-1, B7-2 y CD40L.

Este concepto se ha aplicado satisfactoriamente en la administración tópica del ADN que codifica IL-10. El plásmido B7-1 codificado (un ligando sobre APC) ha potenciado satisfactoriamente la respuesta inmunitaria en modelos antitumorales, u la mezcla de plásmidos que codifican GM-CSF y la proteína del circumsporozoito de *P. yoelii* (PyCSP) ha potenciado la protección contra el estímulo posterior (mientras que el PyCSP codificado solo por plásmido no lo hace). GM-CSF puede hacer que las células dendríticas se presenten al antígeno más eficazmente, y potencia la producción de IL-2 y la activación de los linfocitos TH, impulsando por tanto la respuesta inmunitaria aumentada. Esto puede potenciarse adicionalmente mediante el primer cebado con una mezcla de pPyCSP y pGM-CSF y el posterior refuerzo con un poxvirus recombinante que expresa PyCSP. Sin embargo, la inyección simultánea de plásmidos que codifican GM-CSF (o IFN- γ , o IL-2) y una proteína de fusión de la proteína 1 (extremo C) de la superficie del merozoíto de *P. chabaudi* proteína superficial del virus de la hepatitis B (PcMSP1-HBs) eliminó realmente la protección frente al estímulo, en comparación con la protección adquirida mediante la administración de pPcMSP1-HBs solo.

Otros adyuvantes inmunoestimuladores

En una realización de la divulgación, cualquiera de los siguientes puede utilizarse como un adyuvante inmunoestimulador de la construcción de ácido nucleico o la composición de acuerdo con la divulgación:

20 LPS (lipopolisacárido), Poli-IC (poliinositol citosina) o cualquier otro adyuvante que se parezca al ARN bicatenario, LL37, helicasa RIG-1, IL-12, IL-18, CCL-1, CCL-5, CCL-19, CCL-21, GM-CSF, CX3CL, CD86, PD-1, PD-1 secretada, IL10-R, IL10-R secretada, IL21, ICOSL, 41BBL, CD40L y cualquier otra secuencia de proteína o ácido nucleico que estimula una respuesta inmunitaria.

25 En una realización de la divulgación, el adyuvante inmunoestimulador se fusiona con una proteína de fibra adenovírica. Por ejemplo, CX3CL puede fusionarse con proteínas de fibras adenovíricas.

Motivos CpG inmunoestimuladores

El ADN plásmido parece que tenga por sí mismo un efecto adyuvante sobre el sistema inmunitario. El ADN plásmido ha derivado de bacterias que se ha encontrado que estimulan mecanismos de la defensa inmunitaria innata, La activación de células dendríticas, y la producción de citoquinas TH1. Esto es debido al reconocimiento de determinadas 30 secuencias de dinucleótidos CpG que son inmunoestimuladoras. Las secuencias estimuladoras de CpG (CpG-S) se producen veinte veces con más frecuencia en ADN derivado bacterianamente que en eucariotas. Esto es debido a que los eucariotas presentan "supresión de CpG" - es decir, se producen parejas de dinucleótidos CpG con mucha menos frecuencia que la esperada. Adicionalmente, Las secuencias de CpG-S son hipometiladas. Esto se produce con frecuencia en ADN bacteriano, mientras que los motivos CpG que se producen en eucariotas están todos 35 metilados en el nucleótido citosina. Por el contrario, las secuencias de nucleótidos que inhiben la activación de una respuesta inmunitaria (denominada neutralización de CpG, o CpG-N) están representadas en exceso en genomas eucariotas. La secuencia inmunoestimuladora óptima se ha encontrado que es un dinucleótido CpG sin metilar flanqueado por dos purinas 5' y dos pirimidinas 3'. Adicionalmente, las regiones flanqueantes fuera de este hexámero inmunoestimulador son opcionalmente ricas en guanina para asegurar la unión y la captación en células diana.

40 El sistema inmunitario innato trabaja sinéricamente con el sistema inmunitario adaptativo para montar una respuesta contra la proteína codificada por el ADN. Las secuencias CpG-S inducen la activación de linfocitos B policlonales y la regulación en exceso de la expresión y la secreción de citoquinas. Los macrófagos estimulados secretan IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- α , IFN- β e IFN- γ , mientras que los linfocitos B estimulados secretan IL-6 y algo de IL-12. La manipulación 45 de las secuencias de CpG-S y CpG-N en la estructura principal del plásmido de las vacunas de ADN puede asegurar el éxito de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno codificado, e impulsa la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo TH1. esto es útil si un patógeno requiere una respuesta TH para la protección. Se han usado también las secuencias de CpG-S como adyuvantes externos para la vacunación del ADN y la proteína recombinante con tasas de éxito variables. Otros organismos con motivos CpG hipometilados ha demostrado también la estimulación de la expansión 50 de linfocitos B policlonales. Sin embargo, el mecanismo detrás de esto puede ser más complicados que la simple metilación - no se ha encontrado ADN de murino hipometilado para montar una respuesta inmunitaria.

Formulaciones de ADN

Se puede mejorar la eficacia de inmunización del ADN estabilizando el ADN frente a la degradación y aumentando la eficacia de administración del ADN en las células presentadoras de antígenos. Esto puede conseguirse revistiendo 55 micropartículas catiónicas biodegradables (tales como poli(láctido-co-glicólido) formuladas con bromuro de cetiltrimetilamonio) con ADN. Dichas micropartículas revestidas de ADN pueden ser tan eficaces aumentando los LTC como los virus vaccinia recombinantes, especialmente cuando se mezclan con alum. Las partículas de 300 nm de diámetro parecen ser más eficaces para la captación por las células presentadoras de antígenos.

Administración

Las construcciones y composiciones de ácidos nucleicos de acuerdo con la divulgación pueden administrarse a un individuo en cantidades terapéuticamente eficaces. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una variedad de factores tales como la dolencia del individuo, el peso, el sexo y la edad. Otros factores incluyen el modo de administración.

- 5 En una realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede administrarse a un sujeto en la forma de ADN, ARN, ANB, ANP, ANI, ANIT, AHN, AAN, ANC, ACeN, AGN, ATN, Gap-meros, Mix-meros, Morfolinos, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede administrarse a un sujeto en la forma de ADN.

- 10 En otra realización de la divulgación, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede administrarse a un sujeto en la forma de ARN. Por tanto, la construcción de ácido nucleico puede transcribirse en ARN antes de la administración.

En otra realización más, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede administrarse a un sujeto en la forma de una proteína. Por tanto, la construcción de ácido nucleico puede traducirse en una proteína antes de la administración.

- 15 En la divulgación en la que la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación se administra a un sujeto en la forma de una proteína, La proteína puede haber sido modificada para aumentar la estabilización y/o para optimizar la administración en la célula. La proteína puede tener aumentada la estabilidad debido a la presencia de enlaces disulfuro (por ejemplo, las soluciones de proteínas tratadas según el documento US 5.102.985 en forma reducida con peróxido de hidrógeno para generar proteínas que tienen un puente disulfuro intramolecular con un rendimiento del 90-96 %), un aumento en los restos polares, optimización de la carga superficial, puentes salinos superficiales, encapsulación (por ejemplo, con silicato mesoporoso), o la proteína puede unirse a proteínas de choque térmico (tales como Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90, Hsp-20, Hsp-27, Hsp-84 y otros), dominio de translocación tat de VIH, proteínas de fibras adenovíricas, o cualesquiera otras proteínas o dominios.

- 20 25 Las composiciones farmacéuticas o veterinarias de la divulgación pueden proporcionarse al individuo mediante una variedad de rutas tales como la subcutánea (sc o s.c.), tópica, oral e intramuscular (im o i.m.). La administración de composiciones farmacéuticas se lleva a cabo por vía oral o parenteral. Los procedimientos para la administración parenteral incluyen la administración tópica, intraarterial (directamente al tejido), intramuscular, intracerebral (ic o i.c.), subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa (iv o i.v.), intraperitoneal o intranasal. La divulgación 30 también tiene el objeto de proporcionar formulaciones farmacéuticas tópicas, orales, sistémicas y parenterales para su uso en los procedimientos de cebado de una respuesta inmunitaria con la composición.

- 35 40 Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse en dichas formas de dosificación orales como comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación programada y formulaciones de liberación continua), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o mediante inyección. Asimismo, Se pueden administrar también por vía intravenosa (bolo en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica, con o sin oclusión, o en forma intramuscular, usando todas las formas bien conocidas por aquellas personas normalmente expertas en la materia de las artes farmacéuticas. Puede emplearse una cantidad eficaz, pero no tóxica de la composición, que comprende cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento. También, están abarcadas cualquiera y todas las formas de dosificación convencionales que son conocidas en la técnica son adecuadas para formular composiciones peptídicas inmunógenas inyectables, dichas formas liofilizadas y formas de soluciones, suspensiones o emulsiones contienen, si se requiere, transportadores farmacéuticamente aceptables convencionales, diluyentes, conservantes, adyuvantes, componentes de tampón, etc.

- 45 50 En una realización de la divulgación, la composición para el cebado y/o la vacuna de refuerzo posterior se administra como una formulación de liberación lenta o continua. Los modos de administración preferidos de la construcción o composición de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación incluyen, aunque no de forma limitativa la administración sistémica, tal como la administración intravenosa o subcutánea, la administración intradérmica, administración intramuscular, administración intranasal, administración oral, administración rectal, administración vaginal, administración pulmonar y generalmente cualquier forma de administración mucosal. Además, está comprendido en el ámbito de la divulgación que los medios para cualquiera de las formas de administración mencionadas en el presente documento se incluyen en la divulgación.

Una construcción o composición de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede administrarse una vez, o cualquier número de veces tales como dos, tres, cuatro o cinco veces.

En una realización preferida de la divulgación, la construcción o composición de ácido nucleico se administra una vez, seguido por la administración de una vacuna adecuada.

- 55 En otra realización preferida de la divulgación, la construcción o composición de ácido nucleico se administra como una serie de administraciones antes de administrar la vacuna. Dicha serie puede comprender administrar la construcción o composición de ácido nucleico diariamente, Cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada

cinco días, cada seis días, semanalmente, cada dos semanas o cada tres semanas durante un total de una, dos, tres, cuatro o cinco veces.

- En una realización de la divulgación, el periodo de tiempo entre la primera administración de la construcción o composición de ácido nucleico para cebar el sistema inmunitario y en segundo lugar, la vacuna para el refuerzo se administra con un día de separación, tal como al menos dos días de separación, por ejemplo tres días de separación, tal como al menos cuatro días de separación, por ejemplo cinco días de separación, tal como al menos seis días de separación, por ejemplo siete días de separación, tal como al menos ocho días de separación, por ejemplo nueve días de separación, tal como al menos diez días de separación, por ejemplo quince días de separación, tal como al menos veinte días de separación, por ejemplo veinticinco días de separación.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
- Se pretende por tanto que el cebado con la construcción o composición de ácido nucleico se refuerce además administrando una vacuna. La administración puede ser en una forma o parte del cuerpo diferente de la administración previa o similar a la administración previa.
- La inyección de refuerzo es tanto una inyección de refuerzo homóloga como una inyección de refuerzo heteróloga. Una inyección de refuerzo homóloga es aquella donde la primera y posteriores administraciones comprenden las mismas construcciones y más específicamente el mismo vehículo de administración. Una inyección de refuerzo heteróloga es cuando están comprendidas construcciones idénticas en diferentes vectores.
- Una forma de administración preferida de la composición de acuerdo con la divulgación es administrar la composición al área corporal, dentro o fuera, más probablemente por ser el receptáculo de una infección dada. El receptáculo de la infección es el área corporal en el que se recibe la infección, por ejemplo, con respecto a la gripe, el receptáculo de la infección son los pulmones.
- La construcción o composición de ácido nucleico de la divulgación puede administrarse a cualquier organismo en el cual puede ser beneficiosa, especialmente cualquier animal tal como un animal vertebrado. Está comprendido en el ámbito de la divulgación que los medios y modos de administración de la composición se adapten al receptor.
- Un receptor preferido de la composición es un mamífero y el mamífero es una realización más preferida de la divulgación seleccionada entre el grupo de: vacas, cerdos, caballos, oveja, cabras, llamas, ratones, ratas, monos, perros, gatos, hurones y seres humanos. En la realización más preferida de la divulgación el mamífero es un ser humano.
- Otro receptor preferido de la composición es cualquier vertebrado de la clase aves (pájaro), tal como Gallus gallus domesticus (pollo).
- Una realización de la divulgación incluye una composición que comprende además un segundo principio activo. El segundo principio activo se selecciona entre, aunque no de forma limitativa, el grupo de adyuvantes, antibióticos, quimioterapéuticos, antialergénicos, citoquinas, factores del complemento y moléculas coestimuladoras del sistema inmunitario.
- Otra realización de la divulgación comprende un kit de partes, en el que el kit incluye al menos una construcción o composición de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de lo anterior, un medio para administrar dicha construcción o composición de ácido nucleico y las instrucciones para hacerlo. Está comprendido en el ámbito de la divulgación incluir múltiples dosificaciones de la misma composición o de varias composiciones diferentes. En una realización preferida de la divulgación el kit o partes del kit comprenden además un segundo principio activo. En una realización más preferida de la divulgación, dicho segundo principio activo es una vacuna adecuada, es decir, una vacuna capaz de reforzar el sistema inmunitario sensibilizado mediante un cebado previo de dicha respuesta inmunitaria.
- La divulgación comprende además un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria en un animal, que comprende administrar al animal una construcción o composición de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de lo anterior, seguido por la administración de una vacuna adecuada, cebando y reforzando por tanto el sistema inmunitario de un sujeto.
- La respuesta inmunitaria puede ser, aunque no de forma limitativa, cualquiera de los siguientes tipos de respuestas: una respuesta dependiente de MHC-I, una respuesta dependiente de MHC-I y/o MHC-II, una respuesta dependiente de los linfocitos T, una respuesta dependiente de los linfocitos T CD4⁺, una respuesta independiente de los linfocitos T CD4⁺, una respuesta dependiente de los linfocitos T CD8⁺ T y una respuesta inmunitaria dependiente de los linfocitos B. Las vacunas adecuadas son aquellas que son capaces de reforzar el sistema inmunitario con posterioridad al cebado del sistema inmunitario con la construcción o composición de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación.
- En una realización adicional, la divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de un individuo que lo necesita, que comprende administrar la composición que se describe en el presente documento antes de tratar una dolencia clínica en dicho individuo.

Aumento de la potencia de una vacuna

Una realización de la divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante o la variante de la misma y al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento una proteína o péptido antigénico, en el que al menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de una proteína o péptido antigénico procede de un virus, bacteria o parásito.

- 5 Los datos presentados en el presente documento muestran que no es sencillo desarrollar regímenes de refuerzo del cebado usando construcciones de ácido nucleico que comprenden una cadena invariante o una variante de la misma. Por tanto, como se presenta en la figura 1, una construcción de ADN puro que comprende una cadena invariante y un antígeno (ADN-liGP) es capaz de cebar una respuesta inmunitaria, mientras que una construcción de ADN puro que comprende un antígeno, pero no una cadena invariante (ADN-GP) no es capaz de cebar una respuesta inmunitaria.
- 10 Además, los datos presentados en la figura 12 muestran que un vector adenovírico que comprende un antígeno (AdGP) es capaz de cebar determinadas respuestas inmunitarias (Ad-liGP), pero no todas (Ad-GP), mientras que los datos presentados en la figura 13 muestran que un vector adenovírico que comprende una cadena invariante con un antígeno (Ad-liGP) no es capaz de cebar cualquier respuesta inmunitaria (Ad-liGP y Ad-GP) bajo regímenes de dosificación y tratamiento normales. Sin embargo, es posible optimizar el cebado de Ad-liGP de un refuerzo de Ad-liGP usando dosis más bajas de Ad-liGP para el cebado (como se muestra en la figura 14).
- 15

Es un objeto de la divulgación proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifique al menos una cadena invariante y un antígeno vírico, bacteriano o parasítico o un fragmento de los mismos, en el que dicha cadena invariante es una variante de la cadena invariante, para cebar una respuesta inmunitaria, en el que dicho cebado está seguido por una vacunación de cebado posterior con una vacuna contra el cáncer. Dicha variante de la cadena invariante puede ser cualquier variante como se especifica en otras partes en el presente documento, que comprende una cadena invariante en la que los restos de aminoácidos li-KEY LRMK se han alterado mediante, por ejemplo, delección o sustitución, o en el que parte de la región CLIP se ha alterado mediante, por ejemplo, delección o sustitución.

En una realización, la divulgación se dirige al uso de una construcción de ácido nucleico para aumentar la potencia de una vacuna.

- 25 En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna que comprende las etapas de:
- proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
 - cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
 - reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna que comprende las etapas de:

- proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
- cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada,

40 en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de los restos de aminoácido li-KEY LRMK mediante, por ejemplo, delección o sustitución.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna que comprende las etapas de:

- proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
- cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada,

en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de la región CLIP mediante, por ejemplo, delección o sustitución.

- 50 En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna que comprende las etapas de:
- proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
 - cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y

c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada, en el que dicha variante de la cadena invariante comprende los primeros 17 aminoácidos.

En otra realización, la divulgación se dirige al uso de una construcción de ácido nucleico para cebar una respuesta inmunitaria.

5 En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada,

20 en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de los restos de aminoácido Ii-KEY LRMK mediante, por ejemplo, delección o sustitución.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada,

en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de la región CLIP mediante, por ejemplo, delección o sustitución.

30 En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada, en el que dicha variante de la cadena invariante comprende los primeros 17 aminoácidos.

Aumento de la potencia de una vacuna contra el cáncer

40 Una realización de la divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica al menos una cadena invariante o la variante de la misma y al menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento una proteína o péptido antigénico, en el que al menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de una proteína o péptido antigénico procede de polipéptido específico de cáncer o antígeno de cáncer.

45 Es un objeto de la divulgación proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifique al menos una cadena invariante y un antígeno de cáncer, o un fragmento de los mismos, en el que dicha cadena invariante está en su forma nativa, natural, para cebar una respuesta inmunitaria, en el que dicho cebado está seguido por una vacunación de cebado posterior con una vacuna contra el cáncer.

50 Es un objeto de la divulgación proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifique al menos una cadena invariante y un antígeno de cáncer o un fragmento de los mismos, en el que dicha cadena invariante es una variante de la cadena invariante, para cebar una respuesta inmunitaria, en el que dicho cebado está seguido por una vacunación de cebado posterior con una vacuna contra el cáncer. Dicha variante de la cadena invariante puede ser cualquier variante como se especifica en otras partes en el presente documento, que comprende una cadena invariante en la que los restos de aminoácidos Ii-KEY LRMK se han alterado mediante, por ejemplo, delección o sustitución, o en el que parte de la región CLIP se ha alterado mediante, por ejemplo, delección o sustitución, o en el que se han eliminado los primeros 17 aminoácidos.

Resulta que cuando la vacuna posteriormente administrada utilizada para el refuerzo de una respuesta inmunitaria es una vacuna contra el cáncer, la cadena invariante codificada por la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede estar tanto en su forma nativa, natural como puede ser una variante de la cadena invariante.

5 En una realización, la divulgación se dirige al uso de una construcción de ácido nucleico para aumentar la potencia de una vacuna contra el cáncer.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna contra el cáncer que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma y un péptido o fragmento antigénico del mismo específico de cáncer,
- 10 b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna contra el cáncer adecuada.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna contra el cáncer que comprende las etapas de:

- 15 a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo específico de cáncer,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- 20 c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna contra el cáncer adecuada, en el que dicha cadena invariante está en su forma nativa, natural.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna contra el cáncer que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo específico de cáncer,
- 25 b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna contra el cáncer adecuada,

en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de los restos de aminoácidos li-KEY LRMK mediante, por ejemplo, delección o sustitución y/o alteración de parte de la región CLIP por ejemplo, mediante delección o sustitución, y/o delección de los primeros 17 aminoácidos de li.

En otra realización, la divulgación se dirige al uso de una construcción de ácido nucleico para cebar una respuesta inmunitaria.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- 35 a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma y un péptido o fragmento antigénico del mismo específico de cáncer,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna contra el cáncer adecuada.

40 En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo específico de cáncer,
- 45 b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna contra el cáncer adecuada, en el que dicha cadena invariante está en su forma nativa, natural.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para cebar una respuesta inmunitaria que comprende las etapas de:

- 50 a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo específico de cáncer,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna contra el cáncer adecuada,

en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de los restos de aminoácidos Ii-KEY LRMK mediante, por ejemplo, delección o sustitución y/o alteración de parte de la región CLIP por ejemplo, mediante delección o sustitución, y/o delección de los primeros 17 aminoácidos de Ii.

Aumento de la potencia de una vacuna dirigida a una respuesta fisiológica anómala

5 Es un objeto de la divulgación proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifique al menos una cadena invariante y un polipéptido asociado con una respuesta fisiológica anómala, o un fragmento de los mismos, en el que dicha cadena invariante está en su forma nativa, natural, para cebar una respuesta inmunitaria, en el que dicho cebado está seguido por una vacunación de refuerzo posterior con una vacuna dirigida a dicha respuesta fisiológica anómala.

10 Es también un objeto de la divulgación proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifique al menos una cadena invariante y un polipéptido asociado con una respuesta fisiológica anómala o un fragmento de los mismos, en el que dicha cadena invariante es una variante de la cadena invariante, para cebar una respuesta inmunitaria, en el que dicho cebado está seguido por una vacunación de refuerzo posterior con una vacuna dirigida a dicha respuesta fisiológica anómala. Dicha variante de la cadena invariante puede ser cualquier variante como se especifica en otras partes en el presente documento, que comprende una cadena invariante en la que los restos de aminoácidos Ii-KEY LRMK se han alterado mediante, por ejemplo, delección o sustitución, o en el que parte de la región CLIP se ha alterado mediante, por ejemplo, delección o sustitución, o en el que se han eliminado los primeros 17 aminoácidos de Ii.

15 Resulta que cuando la vacuna posteriormente administrada utilizada para el refuerzo de una respuesta inmunitaria es una vacuna dirigida a dicha respuesta fisiológica anómala, la cadena invariante codificada por la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación puede estar tanto en su forma nativa, natural como puede ser una variante de la cadena invariante.

20 En una realización, la divulgación se dirige al uso de una construcción de ácido nucleico para aumentar la potencia de una vacuna dirigida a una respuesta fisiológica anómala.

En otra realización, la divulgación se dirige al uso de una construcción de ácido nucleico para cebar una respuesta inmunitaria.

25 En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna dirigida a una respuesta fisiológica anómala que comprende las etapas de:

- 30 a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante o una variante de la misma y un péptido o fragmento antigénico del mismo asociado con una respuesta fisiológica anómala,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada dirigida a una respuesta fisiológica anómala.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna dirigida a una respuesta fisiológica anómala que comprende las etapas de:

- 35 a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo asociado con una respuesta fisiológica anómala,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada dirigida a una respuesta fisiológica anómala,

40 en el que dicha cadena invariante está en su forma nativa, natural.

En una realización, la divulgación desvela un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna dirigida a una respuesta fisiológica anómala que comprende las etapas de:

- 45 a. proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende una variante de la cadena invariante y un péptido o fragmento antigénico del mismo asociado con una respuesta fisiológica anómala,
- b. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico de la etapa a), estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
- c. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa b) administrando una vacuna adecuada dirigida a una respuesta fisiológica anómala,

50 en el que dicha variante de la cadena invariante comprende la alteración de los restos de aminoácidos Ii-KEY LRMK mediante, por ejemplo, delección o sustitución y/o alteración de parte de la región CLIP por ejemplo, mediante delección o sustitución, y/o delección de los primeros 17 aminoácidos de Ii.

Tipos de vacunas

Un aspecto de la divulgación se refiere al cebado de una respuesta inmunitaria en un sujeto administrando una construcción de ácido nucleico que comprende un antígeno unido a li, seguido por un refuerzo posterior administrando al mismo sujeto una vacuna adecuada.

- 5 Las vacunas adecuadas de acuerdo con la divulgación tienen al menos una característica idéntica en común con la construcción de ácido nucleico utilizada para cebar una respuesta inmunitaria. Dicha característica idéntica puede estar comprendida en parte o todo de una cadena invariante, parte o todo de un péptido antigénico, parte o todo de una estructura principal tal como parte o toda de una región promotora, parte o todo de un potenciador, parte o todo de un terminador, parte o toda de una cola poli-A, parte o todo de un enlazador, parte o todo de un polienlazador, parte o todo de un enlazador operativo, parte o todo de un sitio de clonación múltiple (MCS), parte o todo de un marcador, parte o todo de un codón de detención, parte o todo de un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES) y secuencias hospedadoras homólogas para la integración u otros elementos definidos.

En una realización preferida de la divulgación, la característica idéntica es parte o todo de un péptido antigénico o un epítopo de linfocito T auxiliar ubicuo. En la realización más preferida de la divulgación, la característica idéntica es parte o todo de un péptido antigénico.

- 15 En otra realización preferida de la divulgación, la característica idéntica es parte o todo de la cadena invariante.

Las vacunas pueden considerarse como tradicionales o innovadoras. Cualquiera de los tipos de vacunas citados en el presente documento pueden utilizarse en la etapa de refuerzo posterior de acuerdo con la divulgación.

Vacunas tradicionales, o vacunas de primera generación, basadas en organismos completos; tanto cepas patógenas que se han destruido, como cepas con patogenicidad atenuada.

- 20 Se han usado técnicas de biología molecular para desarrollar nuevas vacunas, vacunas de segunda generación, basadas en proteínas antigénicas individuales procedentes de los organismos patógenos. Conceptualmente, el uso de péptidos antigénicos más bien que de organismos completos evitaría la patogenicidad proporcionando a la vez una vacuna que contiene los antígenos más inmunógenos. Estos incluyen vacunas basadas en toxoides en compuestos tóxicos inactivados que son bien conocidas, y subunidades de vacunas basadas en un fragmento de una cepa patógena inactivada o atenuada.

25 Vacunas conjugadas: Determinadas bacterias tienen revestimientos externos de polisacáridos que son poco inmunógenos. Uniendo estos revestimientos externos a proteínas (por ejemplo, toxinas), el sistema inmunitario puede conducir al reconocimiento del polisacárido como si fuera un antígeno de proteína.

- 30 Vacunas de vectores recombinantes: combinando la fisiología de un microorganismo y el ADN de otro, se puede crear inmunidad contra enfermedades que tienen procesos de infección complejos.

Las vacunas sintéticas están compuestas principalmente de péptidos sintéticos, carbohidratos o antígenos.

- 35 Las vacunas de ADN (o genéticas), o las vacunas de tercera generación, son nuevos y prometedores candidatos para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas. Las vacunas de ADN se elaboran de un trozo circular pequeño de ADN (un plásmido) que se ha diseñado mediante ingeniería genética para producir uno o más antígenos a partir de un microorganismo. La vacuna de ADN se inyecta en las células del cuerpo, donde la "maquinaria interna" de las células hospedadoras "lee" el ADN y convierte este en proteínas patógenas. Debido a que estas proteínas son reconocidas como extrañas, se procesan por las células hospedadoras y se expresan sobre su superficie, para alertar al sistema inmunitario, que estimula a continuación una gama de respuestas inmunitarias. La fuerza de la respuesta inmunitaria resultante se determina a través de una combinación de la potencia del vector (es decir, el ADN puro, vectores víricos, virus atenuados vivos etc.), el nivel de expresión del antígeno, y el propio antígeno recombinante (es decir, enlazadores de MHC de alta o baja afinidad, determinantes estructurales que seleccionan un repertorio de linfocitos T o linfocitos B más o menos limitado, etc.). Se considera generalmente verdadero, que la inducción eficaz de memoria inmunológica requiere o se beneficia de las interacciones de los linfocitos T CD4⁺ (células auxiliares) con los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos) y los linfocitos B que median muchos de los efectos de la memoria inmunitaria.

- 40 45 En una realización de la divulgación, el cebado de una respuesta inmunitaria con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación es seguido por la administración posterior de una primera generación o vacuna tradicional para el refuerzo de dicha respuesta inmunitaria.

- 50 En una realización de la divulgación, el cebado de una respuesta inmunitaria con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación es seguido por la administración posterior de una segunda generación de vacunas para el refuerzo de dicha respuesta inmunitaria.

En una realización de la divulgación, el cebado de una respuesta inmunitaria con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación es seguido por la administración posterior de una tercera generación o vacuna de ADN para el refuerzo de dicha respuesta inmunitaria.

El uso de una cadena invariante en las construcciones de vacunas de ADN aumenta la inmunogenicidad es bien

conocido en la técnica. En una realización de la divulgación, el cebado de una respuesta inmunitaria con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación es seguido por la administración posterior de una vacuna de ADN que comprende una cadena invariante o una variante de la misma para el refuerzo de dicha respuesta inmunitaria.

- 5 En una realización de la divulgación, el cebado de una respuesta inmunitaria con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación es seguido por la administración posterior de una vacuna de adenovirus para el refuerzo de dicha respuesta inmunitaria.

10 las vacunas pueden ser además *monovalentes* (denominadas también *univalentes*) o *multivalentes* (denominadas también *polivalentes*). Una vacuna monovalente se diseña para inmunizar contra un único antígeno o un único microorganismo. Una vacuna multivalente o polivalente se diseña para inmunizar contra dos o más cepas del mismo microorganismo, o contra dos o más microorganismos.

Descripción detallada de los dibujos

15 **Figura 1: el cebado del ADN con una cadena li basada en una vacuna de ADN puro aumenta significativamente la generación de linfocitos T CD8⁺ específicos de virus tras el posterior refuerzo con un vector vírico muy eficaz.** Los ratones se inmunizaron mediante pistola génica dos veces con 3 semanas de separación con DNA-liGP, DNA-GP o se dejaron sin tratar. Tres semanas después de la última inmunización, se inyectó a todos los ratones en la almohadilla trasera derecha 2×10^7 IFU Ad5-liGP, y 4 semanas después se sacrificaron los animales, y se analizaron los esplenocitos como se ha descrito en la Fig. 1. Numerosos linfocitos T IFN-γ⁺CD8⁺ específicos de epítopos se presenta como media ± SE ($n=5$ ratones/grupo). * denota significancia estadística con respecto a los ratones vacunados solo con Ad5-liGP (test de la suma de rangos de Mann-Whitney). Se representan gráficamente los resultados de uno de dos experimentos similares.

20 **Figura 2: Localización de los dominios y las mutaciones ensayadas en la secuencia li.** Los dominios en WT li se representan gráficamente por encima de la barra. ESS; señal de clasificación endosómica, TM; dominio transmembrana, KEY; región potenciadora de presentación de péptidos, CLIP; péptido de cadena invariante asociado a clase II, TRIM; dominio de trimerización. La extensión de las mutaciones de delección y sustituciones en li está marcada por debajo de la barra. A; Ad-Δ17liGP, b; Ad-liLTMGP, c; Ad-liUTMGP, d; Ad-Δ50liGP, e; Ad-li1 -201 GP, f; Ad-li1-118GP, g; Ad-li1-105GP, h; Ad-liCLIPGP, i; Ad-liKEYGP, j; Ad-li51-118GP.

25 **Figura 3: li aumenta drásticamente la presentación en la superficie celular del epítopo derivado de SIINFEKL/H-2kb OVA.** Las células dendríticas derivadas de médula ósea se transfecaron con Ad-OVA, Ad-liOVA o Ad-liGP (control negativo), y se tiñeron en superficie para las MHC de clase II (células dendríticas maduras teñidas) y con un anticuerpo específico de SIINFEKL/H-2kb (epítopo de OVA).

30 **Figura 4: li trabaja solo en cis.** A) Expresión de li procedente de vectores Ad-liGP y Ad-li + GP; Se normalizó la expresión de li a GAPDH en células COS7 infectadas con 50 moi de Ad-liGP y Ad-li + GP. B) TCR318 GP33 restringió la proliferación de linfocitos Ten respuesta a Ad-GP, Ad-liGP o Ad-li + GP transdujo la BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea).

35 **Figura 5: Las delecciones y sustituciones en el extremo N no afectan la capacidad estimuladora de li.** TCR 318 GP33 restringió la proliferación de linfocitos Ten respuesta a Ad-GP, Ad-liGP, Ad-Δ17liGP, Ad-liLTMGP, Ad-liUTMGP, Ad-Δ50liGP transdujeron las BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea).

40 **Figura 6: Las delecciones y sustituciones en el extremo C no afectan la capacidad estimuladora de li.** TCR 318 GP33 restringió la proliferación de linfocitos Ten respuesta a Ad-GP, Ad-liGP, Ad-li1-205GP, Adli1 -118GP y Ad-li1-105GP transdujeron las BMDC (sistema de cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea).

45 **Figura 7: Solo una delección en el extremo N y el extremo C reduce la capacidad estimuladora de li.** TCR 318 GP33 restringió la proliferación de linfocitos Ten respuesta a Ad-GP, Ad-liGP, Ad-liCLIPGP, Ad-liKEYGP y Ad-li51-118GP transdujeron las BMDC (sistema de cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea).

50 **Figura 8: Respuesta a la dosis de las vacunas Ad-liGP y Ad-GP. Se vacunaron grupos de ratones con las vacunas indicadas en las cepas indicadas.** 14 días después de la vacunación se sacrificaron los ratones, y se estimularon los esplenocitos con los epítopos indicados. Se determinó el número total de esplenocitos CD8⁺ específicos mediante tinción intracelular y análisis FACS. Los datos muestran que Ad-liGP induce respuestas a dosificaciones muy bajas, y por tanto, el cebado con una dosis baja de Ad-liGP (o cualquier antígeno) y el posterior refuerzo con una dosis mayor de Ad-liGP (o cualquier antígeno) puede ser aplicable para los regímenes homólogos de refuerzo del cebado.

55 **Figura 9: Comparación de Ad-GP, Ad-liGP y Ad-liCLIPGP para la presentación de MHC de clase II (estimulación de linfocitos T CD4⁺).** SMARTA GP61-80 restringió la proliferación de linfocitos T en respuesta a Ad-GP, Ad-liGP y Ad-liCLIPGP transdujeron las BMDC que muestra la presentación de un antígeno MHCII aumentado de Ad-liCLIPGP.

55 **Figura 10: Comparación de Ad-GP, Ad-liGP, Ad-GPLamp-1 y Ad-liΔ17GP en un estudio de curso temporal in**

vivo.

Figura 11: Comparación de respuestas de Ad-GP, Ad-liGP, Ad-liΔ17GP, Ad-liKEYGP, Ad-liCLIPGP, Ad-li1-117GP y Ad-li1-199GP *in vivo*.

Figura 12: Ad-GP es capaz de cebar un refuerzo de Ad-liGP posterior. Se vacunaron 3 grupos de ratones C57BL/6 con Ad-GP. 60 días después, estos ratones se dejaron sin molestar, se vacunaron con Ad-GP o se vacunaron con Ad-liGP. Se incluyeron un 4º grupo de ratones que se vacunaron con Ad-GP. 120 días después de las primeras vacunaciones, se sacrificaron los ratones y se cuantificaron las células específicas de antígenos que reconocen los epítopos indicados mediante la reestimulación ex vivo con dichos péptidos y la tinción intracelular para la producción de interferón-γ.

Figura 13: Ad-liGP no es capaz de cebar un refuerzo de Ad-GP o Ad-liGP posterior. Se vacunaron 3 grupos de ratones C57BL/6 con Ad-liGP. 60 días después, estos ratones se dejaron sin molestar, se vacunaron con Ad-GP o se vacunaron con Ad-liGP. Se incluyeron un 4º grupo de ratones que se vacunaron con Ad-liGP. 120 días después de las primeras vacunaciones, se sacrificaron los ratones y se cuantificaron las células específicas de antígenos que reconocen los epítopos indicados mediante la reestimulación ex vivo con dichos péptidos y la tinción intracelular para la producción de interferón-γ. Esto muestra que el cebado de Ad-liGP no se puede reforzar con Ad-liGP, mientras que el cebado de ADN-liGP puede reforzarse con Ad-liGP (véase la figura 1).

Figura 14: Respuesta a la dosis de vacunas de Ad-GP y Adli-Gp. Se vacunaron grupos de ratones con las vacunas indicadas en las cepas indicadas. 14 días después de la vacunación se sacrificaron los ratones, y se estimularon los esplenocitos con los epítopos indicados. Se determinó el número total de esplenocitos CD8⁺ mediante tinción intracelular y análisis FACS.

Figura 15: El receptor de manosa acoplado a una variante de una cadena invariante que comprende los restos 50 a 215 (li50-215), acoplado además a una proteína de fibra adenovírica. La proteína de fibra adenovírica (fibra Ad) puede proceder de cualquier serotipo de adenovirus. El receptor de manosa puede tener uno o más dominios procedentes del receptor de manosa. li puede ser una variante o li de longitud completa. Ag = Antígeno.

25 Ejemplos

Ejemplo 1 (solo para referencia): El cebado con una cadena li basada en una vacuna de ADN puro aumenta significativamente la generación de linfocitos T CD8⁺ específicos de virus tras el posterior refuerzo con un vector vírico optimizado.

El cebado con una vacuna de ADN puro (es decir, una construcción de ácido nucleico) se muestra que aumenta la respuesta inmunitaria aumentada mediante una inmunización posterior con un vector Ad5 (adenovirus serotipo 5). El cebado con ADN-liGP (construcción de ADN que expresa la glicoproteína (GP) de LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica) fusionada a la cadena (li)) demuestra en el presente documento potenciar significativamente la respuesta de linfocitos T CD8⁺ T inducida por la misma construcción génica administrada en un vector de adenovirus serotipo 5 (Ad5-liGP), proporcionando un fuerte argumento para la inclusión de construcciones de ADN basadas en la cadena li en futuros protocolos de inmunización heteróloga ("refuerzo del cebado").

El estudio de los inventores muestra que el efecto de inmunopotenciación del enlace de la cadena li no está limitado al vector Ad5, sino que es relevante también en una plataforma de ADN. Además, dado el hecho de que la cadena li potencia la presentación de más de un epítopo, esto coloca a las vacunas basadas en la cadena li como candidatos muy prometedores para diversos regímenes de refuerzo del cebado heterólogo.

40 Resultados y discusión

Una manera de mejorar la memoria inducida por los linfocitos T es a través de un régimen heterólogo de refuerzo del cebado, por ejemplo, cebado de ADN puro seguid por un refuerzo del vector. teniendo por tanto en el laboratorio de los inventores el vector adecuado, el adenovirus deficiente en la replicación que expresa LCMV GP se fusionó a la cadena li p31 (Ad5-liGP) esta posibilidad se ensayó experimentalmente. En primer lugar, los inventores llevaron a cabo la vacunación convencional del ADN, vacunación mediante pistola génica dos veces con 3 semanas de separación con DNA-liGP o DNA-GP. Tres semanas después la segunda vacunación del ADN, ambos grupos de ratones y controles emparejados se inmunizaron mediante inoculación de 2x10⁷ IFU Ad5-liGP en la almohadilla trasera derecha, y 4 semanas después se enumeró el número de linfocitos T CD8⁺ específicos de virus en el bazo mediante ICCS para IFN-γ y la citometría de flujo. Los ratones cebados con la construcción de ADN fusionada contenían significativamente más linfocitos T IFN-γ⁺CD8⁺T específicos de GP₃₃₋₄₁ y GP₂₇₆₋₂₈₆ que los ratones sin cebar, y se señaló una tendencia similar para las células específicas de GP₉₂₋₁₀₁, aunque en este caso, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, el cebado con ADN puro que codifica GP en ausencia de li tuvo poco efecto sobre el nivel de linfocitos T CD8⁺ de memoria específicos de GP inducidos por una inmunización posterior con Ad5-liGP (figura 1). Debe señalarse que el efecto observado de incluir li no refleja el aumento no específico de la inmunorreactividad de los ratones vacunados, ya que el cebado del ADN con un vector que incluye solo li, pero no GP, no tuvo efecto sobre el nivel de linfocitos T CD8⁺ específicos de GP en ratones a los que se inoculó posteriormente el vector adenovírico (no se muestran los datos).

Los inventores han mostrado que el uso del vector de ADN mejorado como parte de un régimen heterólogo de refuerzo del cebado aumentará significativamente la respuesta inducida en un vector vírico ya optimizado (Holst y col., 2008). esto indica de sólidamente que incluso la inmunización basada en vectores muy inmunógenos puede mejorar adicionalmente mediante un cebado inicial del hospedador con una cadena li basada en una vacuna de ADN puro. En su conjunto, debido a que la fusión de la cadena li con el antígeno conducirá al cebado de una amplia respuesta de linfocitos T CD8⁺, las vacunas de ADN basadas en la cadena li deberían representar una clara ventaja con respecto a las estrategias de prevención frente a virus que mutan rápidamente como parte de los regímenes heterólogos de refuerzo del cebado.

Materiales y procedimientos

10 **Ratones.** Se obtuvieron ratones C57BL/6 (B6) silvestres de Taconic M&B (Ry, Dinamarca). Se reprodujeron localmente ratones B6 deficientes en perforina a partir de parejas de reproductores obtenidos originalmente de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron ratones de siete a 10 semanas de edad en todos los experimentos, y los animales de fuentes externas se dejaron ya aclimatar al entorno local durante al menos 1 semana antes del uso. Todos los animales se alojaron en condiciones específicas exentas de patógenos como se valida mediante el cribado de centinelas. Todos los experimentos animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices nacionales.

15 **Construcción de vacuna de ADN y procedimiento de inmunización.** Las vacunas de ADN se produjeron usando el vector de expresión eucariota pACCMV.pLpA, que contenía tanto la cadena invariante de murino como GP de LCMV o LCMV GP solo. Las construcciones se generaron como se ha descrito recientemente (Holst y col., 2008). La cepa XL1-blue de E. coli (Stratagene, EE.UU.) se transformó con las construcciones mediante electroporación. 20 Secuenciación del ADN usando secuenciación en ciclo, Terminador Big Dye y analizador genético ABI310 (ABIprism, EE.UU.) identificó clones positivos. Se obtuvieron los cebadores de TAG, Copenhagen, Dinamarca. Se produjeron preparaciones de ADN a gran escala usando Qiagen Maxi Prep (Qiagen, EE.UU.).

25 **Inmunización mediante pistola génica.** Se revistió el ADN sobre partículas de oro de 1,6 nm en una concentración de 2 µg DNA/mg de oro, y los complejos de ADN/oro se revistieron sobre tubos de plástico de tal manera que se administraron 0,5 mg de oro al ratón mediante inyección pr. (1 µg DNA inyección pr.) se llevaron a cabo estos procedimientos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biorad, CA, EE.UU.) (Bartholdy y col., 2003). Se inmunizaron los ratones sobre la piel del abdomen usando un dispositivo de pistola génica manipulado manualmente que emplea helio comprimido (2758 kPa (400 psi)) como la fuerza motriz de la partícula. A menos que se mencione lo contrario, se inmunizaron los ratones dos veces con un intervalo de 3-4 semanas y a continuación se dejaron descansar durante 3 semanas antes del estímulo (investigación adicional).

30 **Virus.** Se usó la cepa Armstrong clon 13 de LCMV en la mayoría de los experimentos. A menos que se indique lo contrario, los ratones que se iban a infectar recibieron una dosis de 10⁵ ufp del clon 13 en una inyección iv de 03 ml, o 20 ufp en 0,03 ml en la almohadilla trasera derecha (f.p.). Para la inyección i.c. los ratones recibieron 20 ufp del clon 35 53b Armstrong neurotrópico en un volumen de 0,03 ml. Se produjo el adenovirus deficiente en la replicación que codifica la cadena invariante unida a GP (Ad5-liGP) y se tituló como se ha descrito recientemente (Holst y col., 2008).

Titulación del virus. Se evaluaron los títulos víricos de órganos mediante un ensayo de foco inmunitario como se ha descrito previamente (Battegay y col., 1991).

40 **Agotamiento in vivo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.** Se usaron mAb dirigidos contra CD4 (clon GK1.5) y contra CD8 (clone 53.6.72). Los ratones en los que se iban a agotar las células recibieron una dosis de 200 µg en un volumen de 0,3 ml de PBS intraperitonealmente en los días -1 y 0 con respecto a la infección; para el tratamiento simulado se usó en su lugar IgG purificada de rata (Jackson ImmunoResearch). Se verificó la eficacia del agotamiento celular mediante citometría de flujo.

45 **Estudio de supervivencia.** Se usó la mortalidad para evaluar la gravedad clínica de la meningitis inducida por LCMV aguda. Se controlaron los ratones dos veces al día durante un periodo de 14 días o hasta que se alcanzó una mortalidad del 100 %.

50 **Ensayo de reacción de hinchamiento de la almohadilla específico de LCMV.** Los ratones se infectaron localmente en la almohadilla trasera derecha como se ha descrito anteriormente, y se siguió la reacción de hinchamiento local hasta el día 14 después de la inyección. Se midió el grosor de la almohadilla con un calibre analógico (Mitutoyo 7309, Mitutoyo Co., Tokio, Japón), y se determinó el hinchamiento específico del virus como la diferencia en el grosor e la pata derecha infectada y de la pata izquierda sin infectar (Christensen y col., 1994).

55 **Preparaciones celulares.** Los bazo de ratones se extrajeron asépticamente y se transfirieron a una solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS). Se obtuvieron suspensiones de células individuales presionando los órganos a través de una malla de acero estéril fina. Se lavaron las células dos veces con HBSS, y se ajustó la concentración de células en RPMI 1640 que contenía suero de feto de ternera al 10 % (FCS), suplementado con 2-mercaptoetanol, L-glutamina y una solución de penicilina/estreptomicina.

mAb para la citometría de flujo. Se adquirieron los siguientes mAb de PharMingen (San Diego, CA) como anticuerpos de rata dirigidos contra Ig de ratón: anticuerpo conjugado con FITC dirigido CD44, anticuerpo conjugado con Cy-

Chrome dirigido contra CD8a, anticuerpo conjugado con Cy-Chrome dirigido contra CD4 y anticuerpo conjugado con ficoeritrina(PE) dirigido contra IFN- γ □.

Análisis por citometría de flujo. para la visualización de linfocitos T CD8 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ específicos de LCMV (productores de interferón- γ), se resuspendieron 1-2 x 10 6 esplenocitos en 0,2 ml de medio RPMI completo suplementado con 10 unidades de IL-2 recombinante de murino (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Reino Unido), 3 μ M de monensina (Sigma Chemicals co., St Louis, MO) y 1 μ g/ml de péptido relevante y se incubaron durante 5 horas a 37 °C. Se utilizaron los siguientes péptidos: para los linfocitos CD8 $^{+}$ T GP33-41, GP276-86, GP92-101, GP118-125, y NP396-404 para el control; para los linfocitos CD4 $^{+}$ T GP61-80. Despues de la incubación, se tiñeron las células superficiales, se lavaron, se permeabilizaron y se tiñeron con mAb específico de iFN- γ como se ha descrito anteriormente (Andreasen y col., 2000; Christensen y col., 2003). El anticuerpo emparejado por isotipo sirvió como control para la tinción no específica. Se analizaron las células usando un FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), y al menos 10 4 células vivas se clasificaron usando una combinación de ángulo bajo y dispersión lateral para excluir las células muertas y los desechos. El análisis de datos se realizó usando software Cell-Quest.

Ejemplo 2 (solo para referencia): La activación de los linfocitos T CD8 $^{+}$ potenciados del antígeno unido li es independiente de li nativa

La secuencia li contiene múltiples regiones que funcionan en el procesamiento del antígeno incluyendo: un dominio de clasificación citoplásmico y un dominio de trimerización, un dominio de señalización citoplásmico y un dominio de señalización de la membrana proximal, dominios de trimerización citoplásmicos, intramembrana y periplásmicos, el motivo "key" implicado en las moléculas MHC sin bloquear para facilitar la unión de péptidos exógenos, los motivos de unión para MHC de clase I y II en la región CLIP, un sitio de glicosilación periplásmico así como una región estructuralmente sin identificar de interacción con CD44 y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (figura 2).

el enlace li aumenta la presentación del antígeno en MHC de clase I y II. Utilizando Ad-liOVA (OVA es ovoalbúmina) o la transducción Ad-OVA de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC), Los inventores encontraron que el enlace li indujo por tanto un aumento drástico en la presentación del antígeno restringida por MHC de clase I, como se midió mediante tinción directa con un anticuerpo dirigido contra el epítopo SIINFEKL OVA presentado en H-2Kb (figura 3). La expresión del antígeno restringida por MHC de clase I aumentó a partir de las secuencias unidas a li que trabajan directamente sobre el APC independientemente de MHC de clase II, los linfocitos T CD4 $^{+}$, y cualquier otro tipo de célula y puede medirse directamente en cultivos de células dendríticas.

30 *li en cis*

Para establecer si li trabajó solo *en cis* o también *en trans*, se estableció un marco de lectura adicional en el vector adenovírico sintetizando un promotor de la fosfoglicerato quinasa (pGK) con una señal de poliadenilación de β -globina y clonar esto en la región E3 de la estructura principal del adenovirus. Este vector podría a continuación usarse para la recombinación con el vector lanzadera utilizado para crear el vector Ad-GP (que expresa LCMV GP a partir del marco de lectura E1 bajo el control del promotor de CMV humano y poliA de SV40). El nuevo vector expresa LCMV GP a partir de la región ER1 adenovírica y li a partir de la región E3 (Ad-li+GP). El promotor se verificó para la inducción de las células fluorescentes mediante transfección en células COS7, y una medición de la expresión del ARNm de li en células COS7 infectadas con Ad-liGP y Ad-li+GP confirma que li se expresa al menos tan eficazmente a partir del promotor de pGK, como a partir del promotor del CMV (figura 4A). En comparación con las células TCR318 estimuladas con Ad-GP, Ad-liGP y Ad-li+GP infectaron las BMDC mostrando claramente li debe estar unido al antígeno para tener cualquier efecto (figura 4B). Habría sido sorprendente si la expresión de li *in trans* hubiera mostrado eficacia puesto que los cultivos de BMDC usados para la estimulación expresan ya li.

Alteraciones en el extremo N:

Comenzando desde el extremo N, los inventores realizaron 1) una delección de los primeros 17 aminoácidos (Ad-Δ17liGP), que elimina la Leucina basada en señales de clasificación endosómicas, 2) una sustitución de la primera mitad del segmento transmembrana (Ad-liLTMPG), con el segmento correspondiente procedente del receptor de la quimioquina CCR6 TM6, 3) una sustitución de la segunda mitad del segmento transmembrana con el correspondiente segmento CCR6 TM6 (Ad-liUTMGP), y finalmente 4) una delección completa de los primeros 50 aminoácidos (Ad-Δ50liGP). La última delección eliminó la región proximal de la membrana y la TM citosólica. Ninguna de estas mutaciones tuvo ningún efecto sobre la capacidad de la secuencia li restante de potenciar la estimulación de los linfocitos T CD8 $^{+}$ (figura 5).

Alteraciones en el extremo C:

Desde el extremo C los inventores realizaron delecciones de los últimos 14 aa (Ad-li1-201GP, esto elimina la señal de glicosilación en el extremo C), los últimos 97 aa (Ad-li1-118GP), y los últimos 110 aa (Ad-li1-105GP). No se observó efecto sobre la capacidad de la secuencia li restante para potenciar la estimulación de los linfocitos T CD8 $^{+}$ en la 1-201, mientras que solo podrían observarse tendencias inconsistentes y menores de reducciones desde la mutación 1-105 y las mutaciones 1-118 (figura 6).

Mutaciones:

Los inventores intentaron realizar mutaciones puntuales en el sitio de unión MHC de clase I notificado de la región CLIP (Ad-liCLIPGP: Una mutación puntual doble de M a A - M91A M99A -diseñada para eliminar la interacción li con moléculas MHC de clase I) y el motivo KEY (Ad-liKEYGP: una mutación puntual cuádruple LRMK a AAAA que destruiría el segmento li-Key). Ninguna de estas mutaciones fueron claves para la estimulación potenciada de los linfocitos T CD8⁺ mediada por li. Los únicos datos interesantes llegaron cuando los inventores combinaron los truncamientos en el extremo N y el extremo C. Por tanto, cuando los inventores ensayaron una variante 51-118 (Ad-li51-118GP), se observó una pronunciada reducción en la capacidad estimuladora de los linfocitos T CD8⁺, pero el mutante fue aún superior al Ad-GP (figura 7).

10 Ejemplo 3 (solo para referencia)

En una realización de la divulgación, se proporciona una glicosiltransferasa no humana combinada con proteínas de unión a glicosilo acopladas a li. li puede ser de longitud completa o una variante, en la que la variante puede ser una versión truncada de los restos número 50 a 215 que comprenden li. Esta variante tiene actividad completa a pesar de la ausencia de un dominio transmembrana. Opcionalmente, pueden proporcionarse además uno o más dominios de translocación. En la figura 15 se proporciona un dibujo esquemático de una realización en la que el receptor de manosa (una lectina dependiente de calcio dirigida a menudo a vacunas) se acopla a una variante de la cadena invariante que comprende los restos 50 a 215 (li50-215), acoplada además a una proteína de una fibra adenovírica. La proteína de fibra adenovírica (fibra Ad) puede proceder de cualquier serotipo de adenovirus. El receptor de manosa puede tener uno o más dominios procedentes del receptor de manosa.

20 En un ejemplo específico, se proporciona un adenovirus que expresa Egghead (una proteína de *Drosophila*) en un marco de lectura, y que expresa el receptor de manosa (o los dominios del receptor) acoplado a una variante de li que tiene actividad completa sin una región transmembrana tal como la variante li50-215 acoplada adicionalmente a una proteína de fibra adenovírica en otro marco de lectura.

25 La glicosiltransferasa tal como Egghead y las proteínas de unión a glicosilo tales como el receptor de manosa pueden expresarse a partir de diferentes marcos de lectura en el mismo vector adenovírico, o la glicosiltransferasa tal como Egghead y las proteínas de unión a glicosilo tales como el receptor de manosa pueden expresarse a partir de diferentes vectores adenovíricos administrados simultáneamente.

30 Egghead se acopla a la manosa en todas las proteínas glicosiladas del ER /Retículo endoplasmático). La manosilación de las proteínas secretadas puede por tanto producir la unión de la proteína manosilada al receptor de manosa-li-complejo de fibra Ad (como se muestra en la figura 15). La fibra adenovírica del complejo hace que las proteínas secretadas unidas a dicho complejo sean capturadas por otras células, activando estas para llegar a la estimulación inmunitaria y proporcionar el acceso del complejo al citosol, donde li puede ejercer sus efectos.

Esta tecnología se puede usar para construir una vacuna que puede administrarse directamente en por ejemplo, los cánceres.

35 Listado de referencia

- Andreasen, S. O., Christensen, J. E., Marker, O. y Thomsen, A. R. (2000). Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8⁺ effector T cell responses. *J Immunol* 164, 3689-3697.
- Bartholdy, C., Stryhn, A., Hansen, N. J., Buus, S. y Thomsen, A. R. (2003). Incomplete effector/memory differentiation of antigen-primed CD8⁺ T cells in gene gun DNA-vaccinated mice. *Eur J Immunol* 33, 1941-1948.
- Battegay,M., Cooper,S., Althage,A., Banziger,J., Hengartner,H., y Zinkernagel,R.M. (1991). Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. Virol. Methods* 33:191-198.
- Becker,T.C., Noel,R.J., Coats,W.S., Gomez-Foix,A.M., Alam,T., Gerard,R.D., y Newgard,C.B. (1994). Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol.* 43 Pt A:161-189.
- Christensen, J. P., Marker, O. y Thomsen, A. R. (1994). The role of CD4⁺ T cells in cell-mediated immunity to LCMV: studies in MHC class I and class II deficient mice. *Scand J Immunol* 40, 373-382.
- Christensen, J. P., Kauffmann, S. O. y Thomsen, A. R. (2003). Deficient CD4⁺ T cell priming and regression of CD8⁺ T cell functionality in virus-infected mice lacking a normal B cell compartment. *J Immunol* 171, 4733-4741.
- Diebold, S. S., M. Cotten, N. Koch, y M. Zenke. (2001). MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. *Gene Ther.* 8:487-493.
- Holmes JP, Benavides LC, Gates JD, Carmichael MG, Hueman MT, Mittendorf EA, Murray JL, Amin A, Craig D, von Hofe E, Ponniah S, Peoples GE. (2008). Results of the first phase I clinical trial of the novel li-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine. *J Clin Oncol.* Jul 10;26(20):3426-33.

- Holst, P. J., Sorensen, M. R., Mandrup Jensen, C. M., Orskov, C., Thomsen, A. R. y Christensen, J. P. (2008). MHC Class II-Associated Invariant Chain Linkage of Antigen Dramatically Improves Cell-Mediated Immunity Induced by Adenovirus Vaccines. *J Immunol* 180, 3339-3346.
- 5 Kallinteris NL, Lu X, Blackwell CE, von Hofe E, Humphreys RE, Xu M. (2006). li-Key/MHC class II epitope hybrids: a strategy that enhances MHC class II epitope loading to create more potent peptide vaccines. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6(12):1311-1321.
- Morris, C. R., A. J. Reber, J. L. Petersen, S. E. Vargas, y J. C. Solheim. (2004). Association of intracellular proteins with folded major histocompatibility complex class I molecules. *Immunol.Res.* 30:171-179.
- Pieters, J. (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 9:89-96.
- 10 Sambrook y col., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 2^a Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Strumpter-Cuvelette, P., y P. Benaroch. (2002). Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1542:1-13.
- documentos WO 2007/062656
- 15 US 2008/0095798
- documentos WO 2003/089471
- US 5.554.372
- US 5.876.735
- 5.102.985
- 20 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Holst, Peter Johannes Thomsen, Allan Randrup Christensen, Jan Pravsgaard Grujic, Mirjana
- <120> CEBADO DE UNA RESPUESTA INMUNITARIA
- <130> P1982DK00
- <140> PA 2008 01638
- 25 <141> 21/11/2008
- <160> 4
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- <211> 1287
- 30 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens - Cadena invariante
- <400> 1

ctgcaggggg gggggggggg gggggggaca ttggctttc cttggggagt gatgcacagg 60
 aggagaagca ggagctgtcg ggaagatcag aagccagtc tggatgacca gcgcgacctt 120
 atctccaaca atgagcaact gcccatgtg ggccggccgc ctggggcccc ggagagcaag 180
 tgcagccgctg gagccctgtt cacaggctt tccatccctgg tgactctgtct cctcgctggc 240
 caggccacca ccgcctactt cctgtaccag cagcagggcc ggctggacaa actgacagtc 300
 acctcccaga acctgcagct ggagaacctg cgcatgaagc ttcccaagcc tcccaagcct 360
 gtgagaaga tgcgcatgac caccggctg ctgatgcagg cgctgcccatt gggagccctg 420
 ccccaaaaaa ccatgcagaa tgccaccaag tatggcaaca tgacagagga ccatgtgatg 480
 cacctgctcc agaatgctga cccctgtaa gtttaccggc cactgaaggg gagcttcccg 540
 gagaacctga gacaccccaa gaacaccatg gagaccatag actggaaaggt ctttgagagc 600
 tggatgcacc attggctctt gtttggaaatg agcaggcaact ctttggagca aaagcccaact 660
 gacgctccac cgaaaagatc actgaaactg gaggaccgtt ctttgggctt gggtgtgacc 720
 aagcaggata tggggcccaat cccatgtga gagcagcaga ggcggctttc aacatctgc 780
 cagccccaca cagctacagc tttttgttc ctttgcggcc ccagccccctc cccatctcc 840
 caccctgtac ctcatcccat gagaccctgg tgcctggctt ttttgttacc ctttggacaag 900
 acaaaccaaag tcggaacagc agataacaat gcagcaaggc cctgtgtccc aatctccatc 960
 tgtcaacagg ggcgtgaggt cccaggaagt ggccaaaagc tagacagatc cccgttccctg 1020
 acatcacagc agcctccaaac acaaggctcc aagacctagg ctcatggacg agatggaaag 1080
 gcacagggag aagggataac ctttgcggcc tggacatgtct gactgttccctc 1140
 tccccccat ctttggctt tggctttctt agcctattta ctttgcggctt gagccactct 1200
 cttcccttcc cccagcatca ctcccccaagg aagagccaaat gttttccacc catccctccc 1260
 cccccccccc cccccccccc cctgcag 1287

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens - Cadena invariante

<400> 2

Met	Asp	Asp	Gln	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Asn	Glu	Gln	Leu	Pro	Met
1					5				10						15
Leu	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Glu	Ser	Lys	Cys	Ser	Arg	Gly	Ala
						20			25						30
Leu	Tyr	Thr	Gly	Phe	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Gln
						35			40						45
Ala	Thr	Thr	Ala	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gln	Gly	Arg	Leu	Asp	Lys	
						50			55						60
Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Met	Lys
65					70				75						80
Leu	Pro	Lys	Pro	Pro	Lys	Pro	Val	Ser	Lys	Met	Arg	Met	Ala	Thr	Pro
						85			90						95
Leu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Leu	Pro	Gln	Gly	Pro	Met
						100			105						110
Gln	Asn	Ala	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asn	Met	Thr	Glu	Asp	His	Val	Met	His
						115			120						125
Leu	Leu	Gln	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	Lys	Gly
						130			135						140
Ser	Phe	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Met	Glu	Thr	Ile
145						150				155					160
Asp	Trp	Lys	Val	Phe	Glu	Ser	Trp	Met	His	His	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu
						165			170						175
Met	Ser	Arg	His	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Pro	Lys
						180			185						190
Glu	Ser	Leu	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Thr	Lys
						195			200						205
Gln	Asp	Leu	Gly	Pro	Val	Pro	Met								
					210				215						

<210> 3

<211> 648

<212> ADN

5 <213> Mus Musculus - Cadena invariante

<400> 3

```

atggatgacc aacgcgacct catctctaac catgaacagt tgcccatact gggcaaccgc 60
cctagagagc cagaaaagggtg cagccgtgga gctctgtaca ccggtgtctc tgcctggtg 120
gctctgctct tggctggca ggccaccact gcttacttcc tgtaccagca acagggccgc 180
ctagacaagc tgaccatcac ctcccagaac ctgcaactgg agagcttcg catgaagctt 240
ccgaaatctg ccaaaccctgt gagccagatg cggatggcta ctcccttgct gatgcgtcca 300
atgtccatgg ataacatgtct ccttggccct gtgaagaacg ttaccaagta cggcaacatg 360
acccaggacc atgtgatgca tctgctcacg aggtctggac ccctggagta cccgcagctg 420
aaggggacct tcccagagaa tctgaagcat cttaagaact ccatggatgg cgtgaactgg 480
aagatcttcg agagctggat gaagcagtgg ctcttggttt agatgagcaa gaactccctg 540
gaggagaaga agcccacca ggcctccacaa aaagagccac tggacatggaa agacstatct 600
tctggcctgg gagtgaccag gcaggaactg ggtcaagtca ccctgtga 648

```

<210> 4

<211> 215

<212> PRT

10 <213> Mus Musculus - Cadena invariante

<400> 4

ES 2 743 677 T3

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile		
1	5	10
Leu Gly Asn Arg Pro Arg Glu Pro Glu Arg Cys Ser Arg Gly Ala Leu		
20	25	30
Tyr Thr Gly Val Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala		
35	40	45
Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu		
50	55	60
Thr Ile Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Ser Leu Arg Met Lys Leu		
65	70	75
Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Gln Met Arg Met Ala Thr Pro Leu		
85	90	95
Leu Met Arg Pro Met Ser Met Asp Asn Met Leu Leu Gly Pro Val Lys		
100	105	110
Asn Val Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Gln Asp His Val Met His Leu		
115	120	125
Leu Thr Arg Ser Gly Pro Leu Glu Tyr Pro Gln Leu Lys Gly Thr Phe		
130	135	140
Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Asn Ser Met Asp Gly Val Asn Trp		
145	150	155
Lys Ile Phe Glu Ser Trp Met Lys Gln Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser		
165	170	175
Lys Asn Ser Leu Glu Glu Lys Lys Pro Thr Glu Ala Pro Pro Lys Glu		
180	185	190
Pro Leu Asp Met Glu Asp Leu Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Arg Gln		
195	200	205
Glu Leu Gly Gln Val Thr Leu		
210	215	

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican
 - a. al menos una variante de una cadena invariante unida operativamente a
 - b. al menos una proteína o péptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteína o péptido,
- 5 en la que la al menos una variante de una cadena invariante comprende solo:
 - (i) las secuencias adyacentes al extremo N de la región KEY de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2 pero sin la propia región KEY o
 - (ii) una secuencia de al menos 15 aminoácidos adyacentes al extremo N de la región KEY de la cadena invariante de la SEQ ID NO: 2 pero sin la propia región KEY, en la que los al menos 15 aminoácidos se encuentran dentro de los 30 restos de la región KEY.
- 10 2. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la al menos una proteína o péptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteína o péptido procedente de un organismo patógeno se selecciona entre el grupo de patógenos que comprende: virus, microorganismos y parásitos.
- 15 3. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en la que al menos una proteína o péptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteína o péptido es de un polipéptido específico de cáncer.
- 20 4. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el enlazador operativo entre la al menos una variante de una cadena invariante y la proteína o péptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteína o péptido es un enlace directo.
- 25 5. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el enlazador operativo entre la al menos una variante de una cadena invariante y la proteína o péptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteína o péptido es una región separadora.
- 30 6. Un vehículo de administración que comprende la construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. El vehículo de administración de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el vehículo se selecciona entre el grupo de: vehículos basados en ARN, vehículos / vectores basados en ADN, vehículos basados en lípidos, vehículos basados en polímeros y vehículos de ADN o ARN derivados de virus.
8. Una proteína químérica que comprende al menos una variante unida operativamente de una cadena invariante y al menos una proteína o péptido antigenico codificada por cualquiera de las construcciones de ácido nucleico en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 9. Una composición que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como un medicamento.
10. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un procedimiento para aumentar la potencia de una vacuna que comprende las etapas de
 - a. cebar el sistema inmunitario de un sujeto administrando la construcción de ácido nucleico, estimulando por tanto una respuesta inmunitaria en dicho sujeto, y
 - b. reforzar la respuesta inmunitaria de la etapa a) administrando una vacuna adecuada.

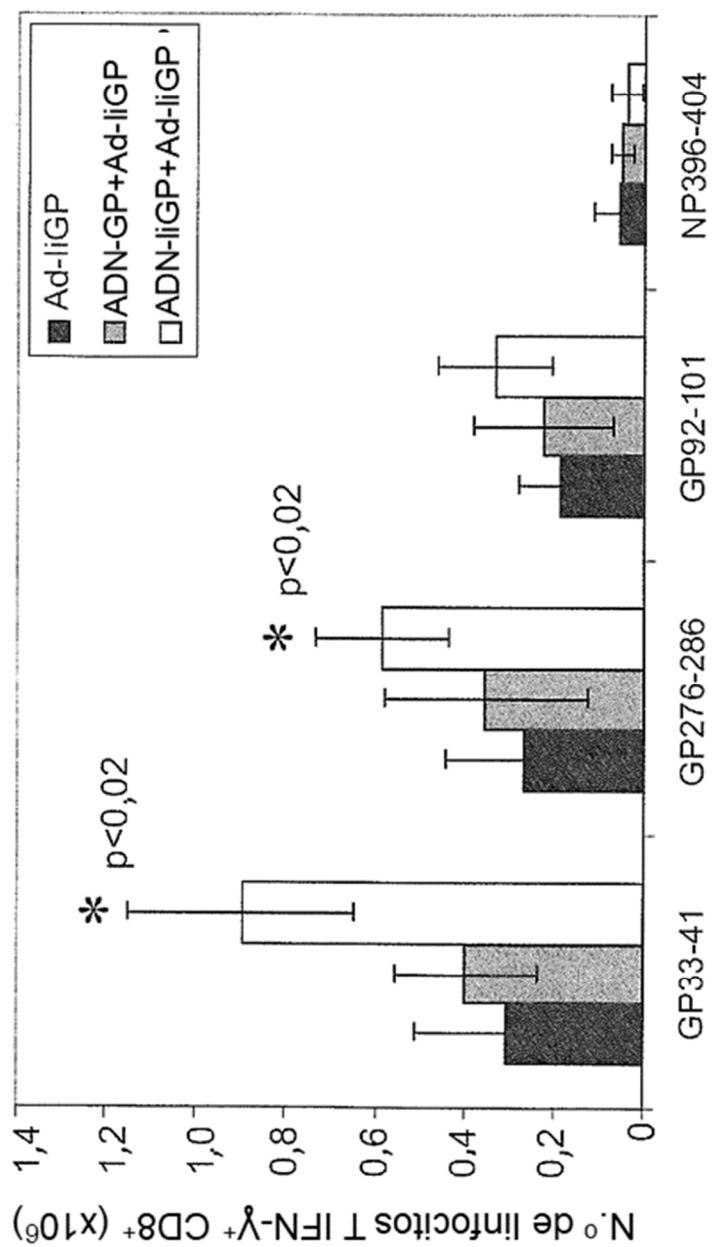


Figura 1

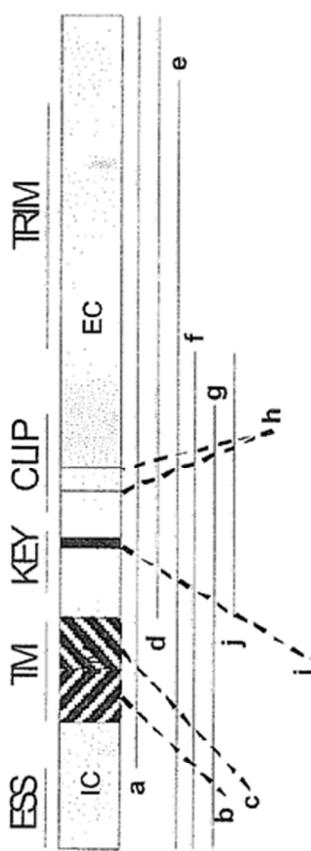
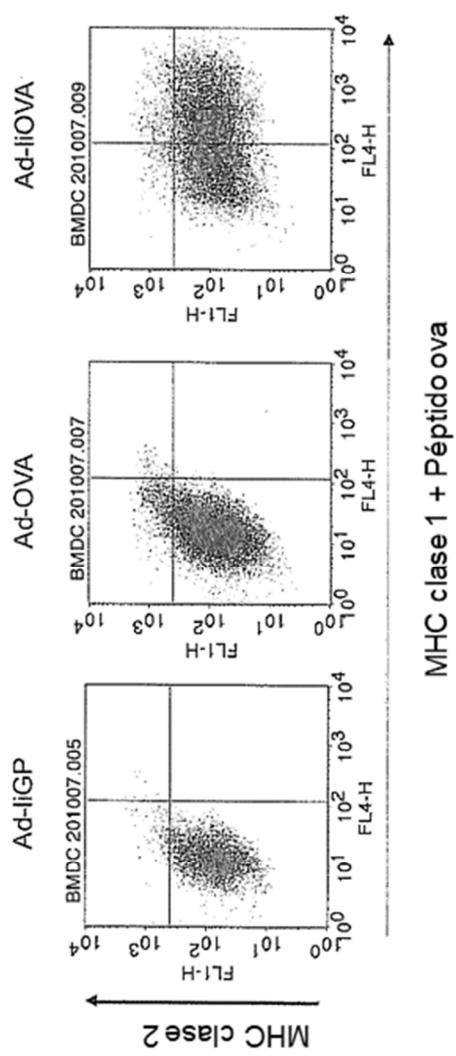


Figura 2



MHC clase 1 + Péptido ova

Figura 3

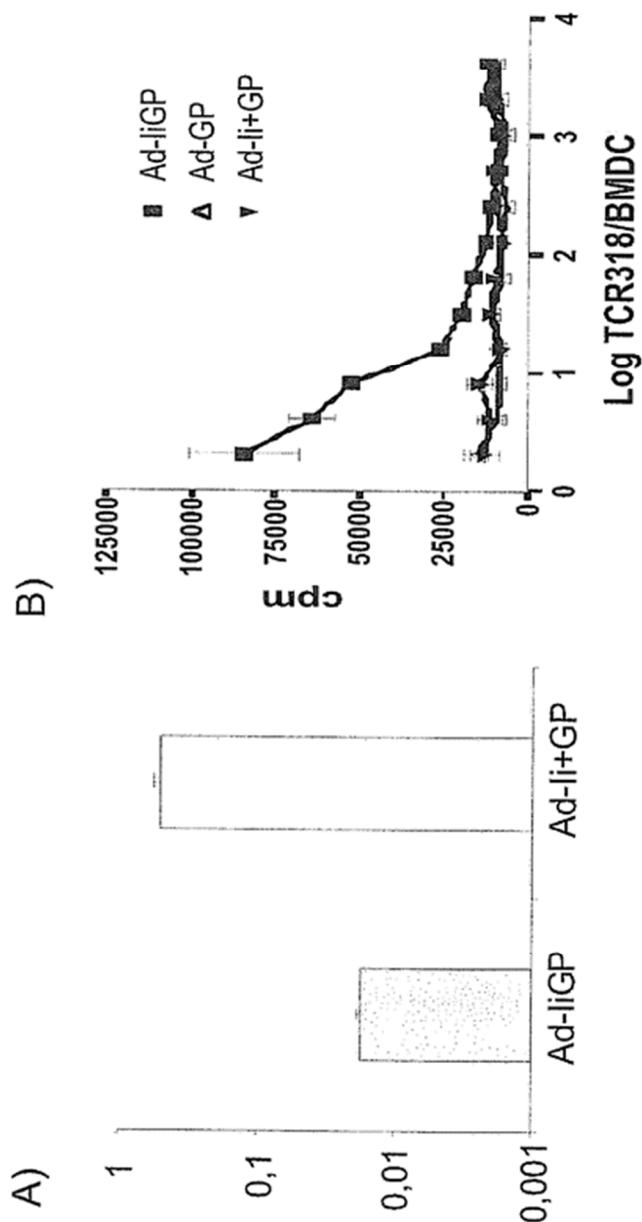


Figura 4

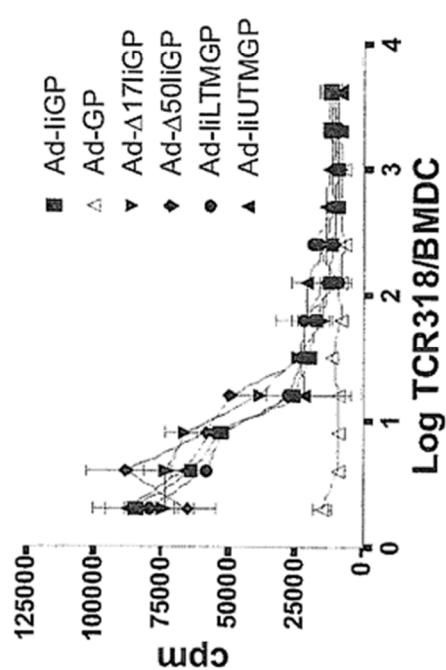


Figura 5

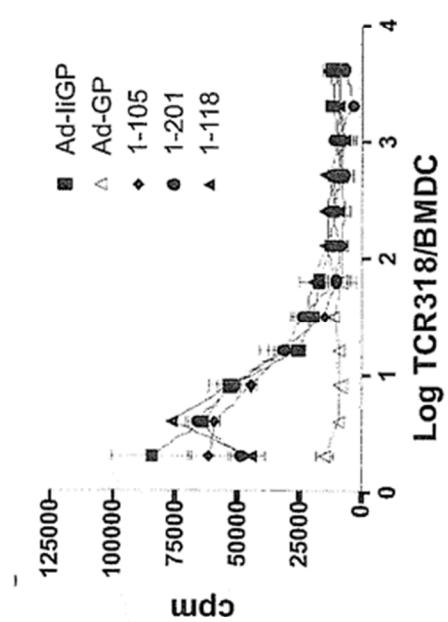


Figura 6

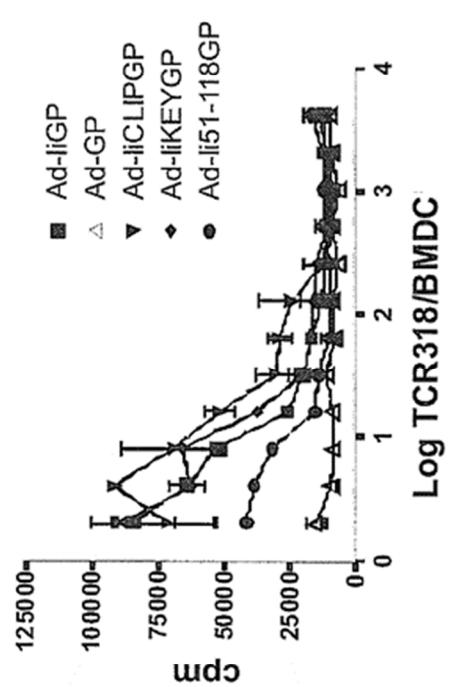


Figura 7

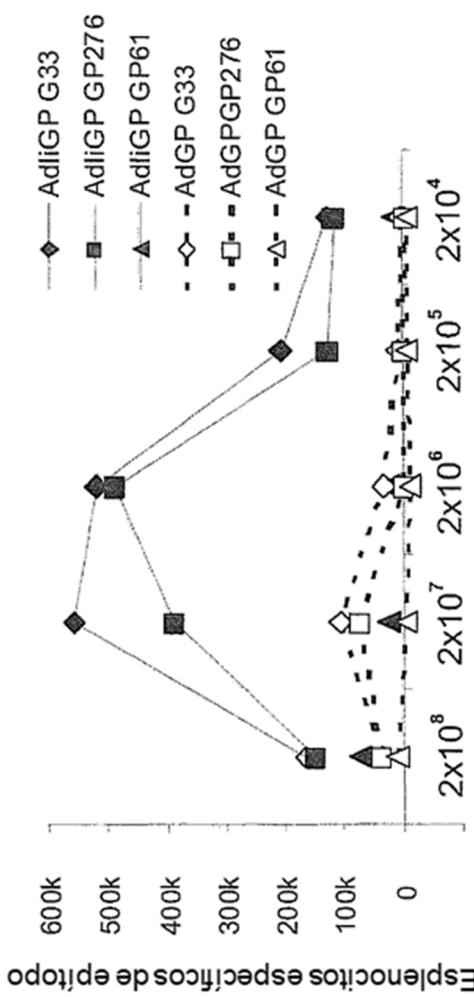


Figura 8

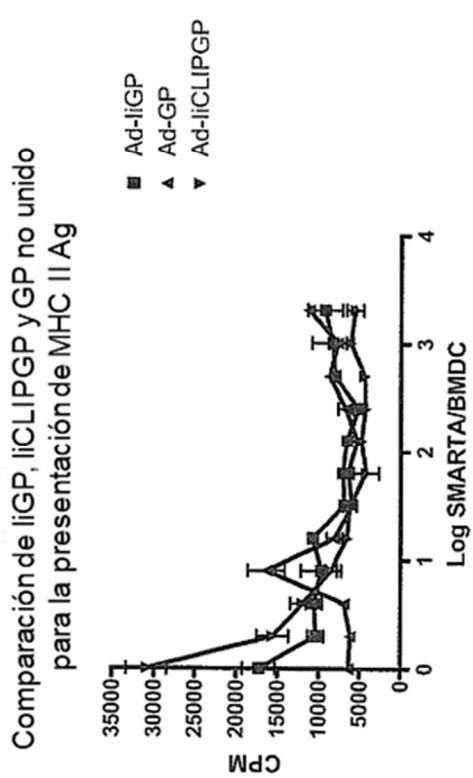


Figura 9

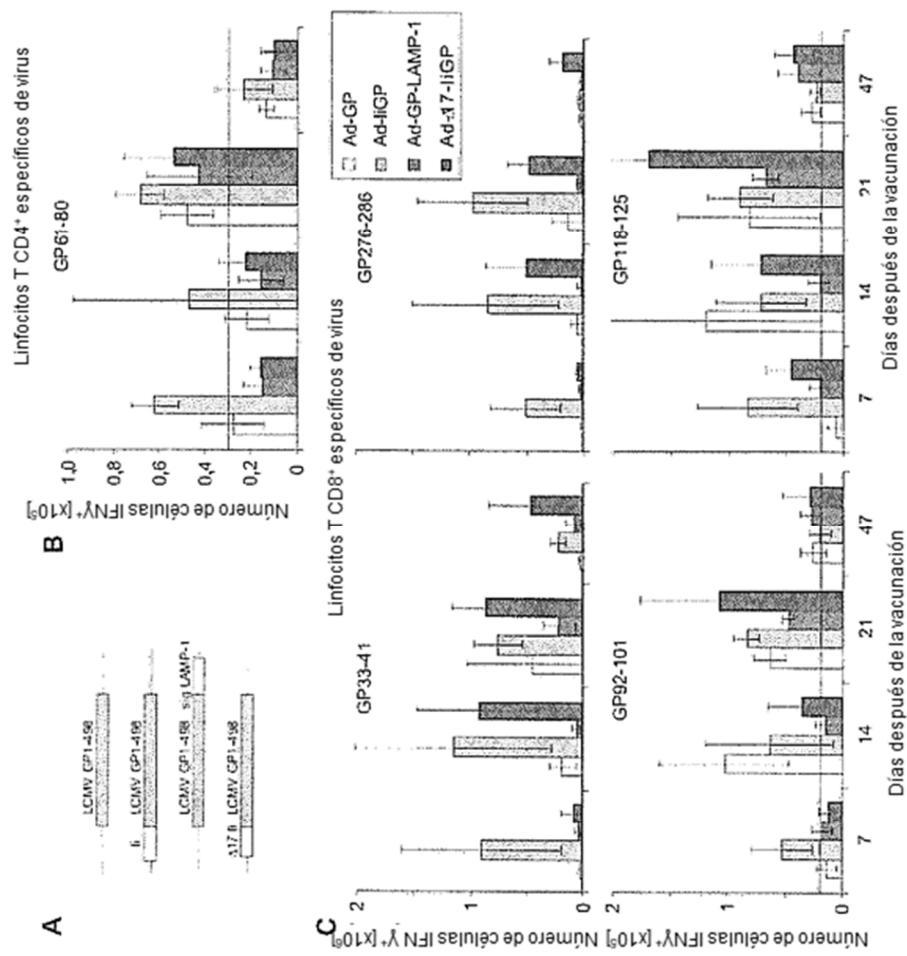


Figura 10

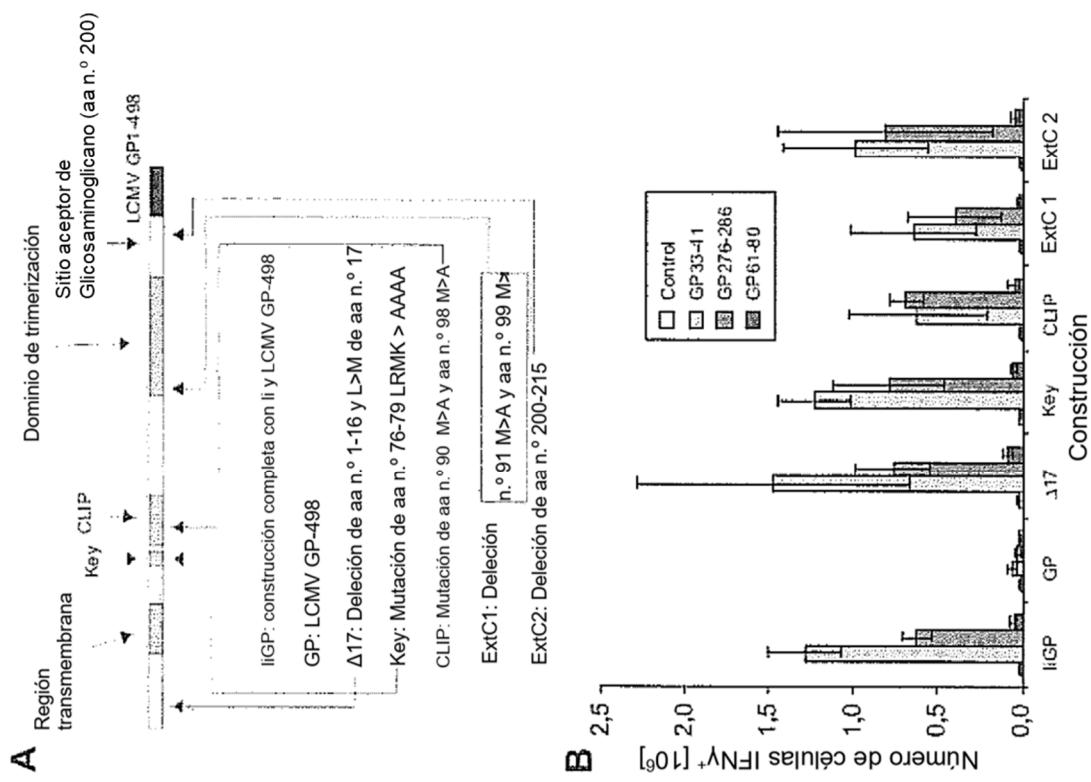


Figura 11

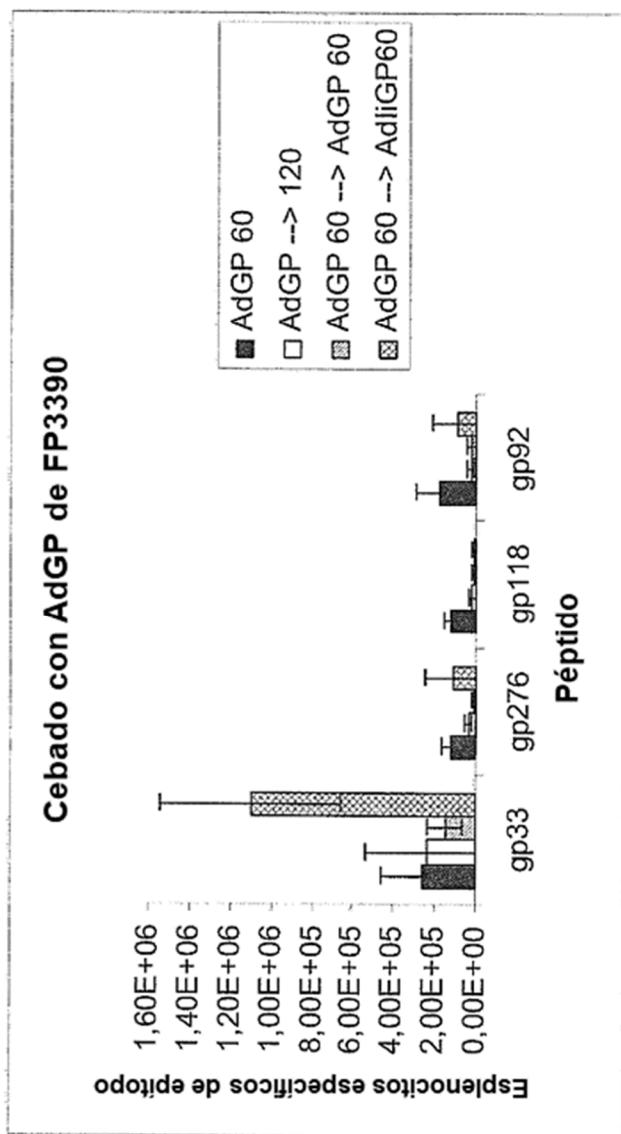


Figura 12

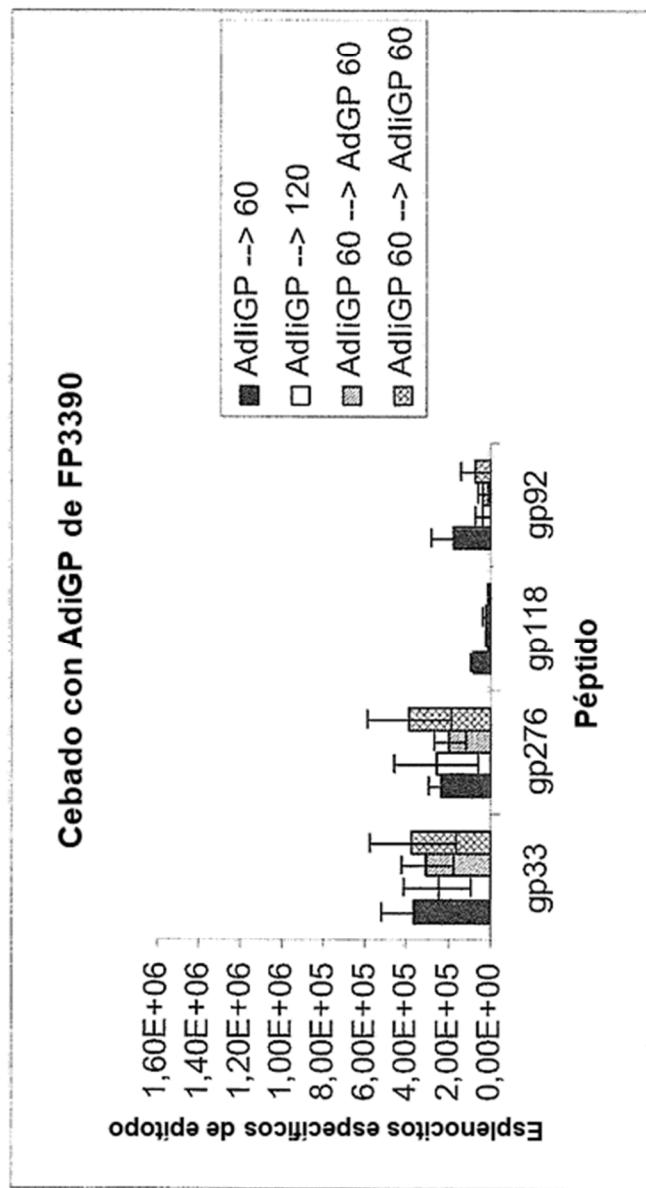


Figura 13

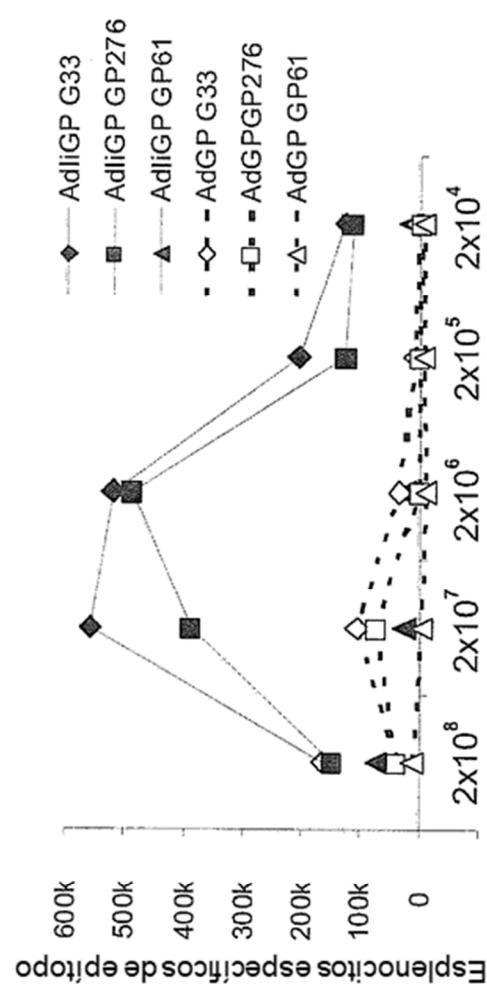


Figura 14

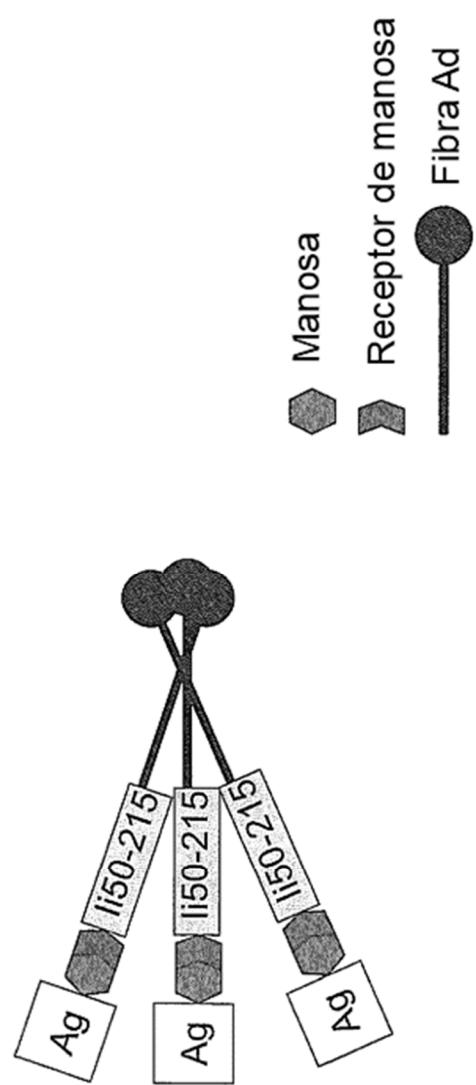


Figura 15