



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 261**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/79** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00920193 .0**  
86 Fecha de presentación : **07.04.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1171617**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

54 Título: **Potenciación de la respuesta inmune para aplicaciones de vacunas y terapia génica.**

30 Prioridad: **08.04.1999 US 128409 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2008**

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**  
**4560 Horton Street**  
**Emeryville, California 94608, US**

72 Inventor/es: **Polo, John, M.;**  
**Dubensky, Thomas, W., Jr.;**  
**Belli, Barbara, A.;**  
**Perri, Silvia y**  
**Fong, Timothy**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 300 261 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

Potenciación de la respuesta inmune para aplicaciones de vacunas y terapia genética.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere de manera general a composiciones y procedimientos farmacéuticos, y más específicamente, a una diversidad de composiciones y procedimientos adecuados para el incremento, potenciación, o estimulación de una respuesta inmune, particularmente para aplicaciones de vacunas profilácticas y terapéuticas en las áreas de enfermedad infecciosa y cáncer.

**Antecedentes de la invención**

Se ha acometido una investigación substancial con el fin de verificar la posibilidad de que el curso de la enfermedad pueda ser afectada a través de la introducción de ácidos nucleicos dentro de organismos vivos. Cuando se ha usado para fines médicos, dicha terapia, denominada “terapia de genes”, permite la alteración del repertorio genético de células para un beneficio terapéutico.

Se han descrito una diversidad de procedimientos para el suministro de ácidos nucleicos a células, incluyendo por ejemplo, el uso de vectores víricos obtenidos de retrovirus, adenovirus, poxvirus, virus del herpes, y virus adenoasociados (véase, Jolly, *Cancer Gene Therapy*, vol. 1, págs. 51-64, (1994)), así como técnicas de transferencia directa de ácido nucleico, incluyendo inyección directa de ADN (Donnelly, J.J. y otros, *Ann. Rev. Immunol.*, vol. 15, págs. 617-648, (1997)), bombardeo con micro-proyectiles (Williams y otros, *PNAS*, vol. 88, págs. 2726-2730, (1991)), y complejos de ácido nucleico con lípidos de diversos tipos (Felgner y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, págs. 7413-7417, (1989)). Muchas de estas estrategias han sido aplicadas ampliamente, con ensayos clínicos actualmente en marcha para una amplia gama de enfermedades hereditarias (por ejemplo, deficiencia de ADA, fibrosis quística, hemofilia) y adquiridas (por ejemplo, cáncer, infección vírica) (Crystal, *Science*, vol. 270, págs. 404-410, (1995)).

Una aplicación particularmente importante de la terapia de genes es en el campo de las vacunas. En resumen, las vacunas de virus vivos (por ejemplo, vaccinia, polio, sarampión) han sido enormemente satisfactorias y han tenido un impacto histórico y dramático sobre la salud pública. Sin embargo, para ciertos patógenos, tal como VIH, la seguridad que concierne tanto a la reversión de cepas de vacunas atenuadas a fenotipos virulentos, como a la inducción a una infección fulminante en individuos inmuno-comprometidos, ha forzado el desarrollo de vacunas de virus inactivados o subunidades. Desgraciadamente, en muchos casos, estas vacunas no han provocado las potentes respuestas inmunes humoral, celular, y mucosal de amplia base o de memoria a plazo largo necesarias para conferir protección durante un periodo largo de vida a individuos inmunizados. La inducción de dichas respuestas inmunes potentes sería particularmente importante para vacunas contra la infección por VIH y HCV, ambas de las cuales han alcanzado proporciones epidémicas mundiales y han probado ser, hasta la fecha, elusivas a las vacunas candidatas.

Las vacunas basadas en ADN plásmido, aún relativamente nuevas, combinan los últimos desarrollos de biología molecular con un conocimiento siempre creciente de la inmunología, y muestran ser prometedoras para la inmunización contra la infección con patógenos, tal como VIH, así como otras enfermedades para las cuales se necesitan vacunas mejoradas (por ejemplo, virus de influenza). De manera importante, la inmunización de ADN provoca las respuestas inmunes humoral y celular en roedores y primates no humanos. El ADN es un modo atractivo para la vacunación, ya que proporciona las ventajas de la seguridad de las vacunas de virus inactivados o subunidades, e induce las respuestas de célula T citotóxica restringida al MHC de clase I típicas del virus vivo, o vacunas de “antígeno replicante”, las cuales pueden ser críticas con respecto a la eficacia (Donnelly, J.J y otros, véase cita anterior).

Sin embargo, desgraciadamente, los ensayos clínicos de vacunas de ADN recientes han demostrado que, aunque se observaron respuestas de linfocito T citotóxico específicas del antígeno en individuos vacunados, estas respuestas fueron insuficientes para proporcionar protección contra la exposición con el agente infeccioso (Wang, R. y otros, *Science*, vol. 282, págs. 476-480, (1998); Calarota, S. y otros, *Lancet*, vol. 351, págs. 1320-1325, (1998)). De acuerdo con ello, para que la vacunación a base de ADN llegue a ser un procedimiento ampliamente usado para protección contra una enfermedad infecciosa y cáncer, la tecnología debe ser mejorada adicionalmente. En *Gene*, vol. 164, págs. 9-15, (1995), N. Mertens y otros, describen cajas de expresión usadas para la transcripción de ARNs cortos, en los cuales las cajas comprenden promotores procarióticos ligados de manera operable a un gen heterólogo que codifica interferón humano o murino. En *Journal of Interferon Research*, vol. 9, págs. 543- 550, (1989), S. Gessani y otros, implican la inducción de interferón en células C127 usando ARN de doble hebra exógeno.

La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para potenciar la eficacia de vectores de ADN, así como una diversidad de otros vectores de suministro de genes, usados para inmunización genética. Dichas mejoras pueden incluir modificaciones inmunoestimuladoras al propio vector de expresión del antígeno, o la administración *in vivo*, conjuntamente con el vector de expresión del antígeno, de uno o más vectores de suministro de genes adicionales que son inmunoestimuladores. Las mejoras aquí descritas están dirigidas a las dificultades previas asociadas con el uso de vectores de suministro de genes mediante la potenciación de la extensión de la respuesta inmune específica del antígeno, proporcionando, de esta forma, las respuestas amplias y firmes críticas para la vacunación profiláctica o terapéutica satisfactoria contra agentes infecciosos y cáncer.

## Sumario de la invención

Expresado de forma resumida, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para el incremento, potenciación, o estimulación de una respuesta inmune. Por ejemplo, dentro de un aspecto de la invención, se proporcionan cajas de expresión que comprenden un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe *in vivo*, forma un ARN de doble hebra que induce la producción de interferón (alfa, beta o gamma) tanto directamente como indirectamente, el cual a su vez puede sobrerregular moléculas de MHC de Clase I y/o Clase II, estimulando, de esta forma, una respuesta inmune.

Dentro de un aspecto de la presente invención, se proporcionan cajas de expresión que comprenden un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe *in vivo*, forma ARN de doble hebra que induce la producción de interferón, en el que la caja de expresión está seleccionada entre el grupo constituido por: (a) una caja de expresión que, cuando se transcribe *in vivo*, forma ARN auto-complementario; y (b) una caja de expresión que comprende un primer promotor ligado de manera operable a una primera molécula de ácido nucleico, y un segundo promotor ligado de manera operable a una segunda molécula de ácido nucleico, en el que la primera y segunda moléculas de ácido nucleico, cuando se transcriben *in vivo*, forman un ARN de doble hebra que induce la producción de interferón. Dentro de diversas realizaciones de la invención, el ARN puede ser o bien de codificación o bien de no codificación.

Pueden proporcionarse cajas de expresión que comprenden un promotor ligado de manera operable a un ribozima o molécula de ácido nucleico antisentido que, cuando se transcribe *in vivo*, forma un ribozima o molécula de ARN antisentido que estimula una respuesta inmune. El ribozima o molécula antisentido puede inhibir la expresión de una proteína que puede inhibir al menos un aspecto de una respuesta inmune. Los ejemplos representativos de proteínas adecuadas que pueden ser inhibidas de acuerdo con ello, incluyen IRF2, YY1, IL-10, TGF- $\beta$  y ciclooxigenasa. Debería indicarse que la inhibición de la expresión de la proteína puede producirse en ciertos casos mediante la unión y/o escisión de ARNm por el ribozima o molécula antisentido.

Pueden proporcionarse cajas de expresión que comprenden un promotor ligado de manera operable a un ribozima o molécula de ácido nucleico antisentido que, cuando se transcribe *in vivo*, estimulan la apoptosis. Los ejemplos representativos de ribozimas o moléculas antisentido adecuados incluyen aquellos que escinden o inhiben dianas dentro de una cascada de apoptosis, incluyendo por ejemplo Bcl-2 y Bcl-xL.

Dentro de otros aspectos, se proporcionan cajas de expresión que comprenden un primer promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe *in vivo*, forma ARN de doble hebra que induce la producción de interferón, y un segundo promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno a partir de un agente patógeno. Las cajas de expresión pueden comprender un primer promotor ligado de manera operable a un ribozima o molécula de ácido nucleico antisentido que, cuando se transcribe *in vivo*, estimula la apoptosis, y un segundo promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno a partir de un agente patógeno. Dentro de ciertas realizaciones, el agente patógeno es un virus, bacteria, hongo, parásito o célula cancerosa. Las cajas de expresión pueden dirigir la expresión tanto de un polipéptido que promueve la apoptosis como de un antígeno a partir de un agente patógeno. El antígeno a partir del agente patógeno y el polipéptido que promueve la apoptosis están expresados a partir de promotores separados. Los ejemplos representativos de polipéptidos pro-apoptóticos incluyen Bax, Bik, Bcl-xL. Como alternativa, el polipéptido y el antígeno pueden transcribirse a partir del mismo promotor y expresarse mediante un Sitio de Entrada de Ribosoma Interno o ribosoma de lectura completa.

Dentro de diversas realizaciones, cualquiera de las cajas de expresión anteriores pueden contener un promotor ARN polimerasa I, ARN polimerasa II (por ejemplo, CMV, SV40, MoMLV LTR y RSV LTR), o ARN polimerasa III (por ejemplo, un promotor Adenovirus VA1).

Las cajas de expresión anteriormente indicadas pueden comprender además un promotor adicional ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés. El promotor puede ser un promotor ARN polimerasa II (por ejemplo, CMV, SV40, MoMLV LTR y RSV LTR). Pueden expresarse una amplia variedad de polipéptidos, incluyendo por ejemplo polipéptidos que promueven la apoptosis, antígenos a partir de un agente patógeno, enzimas que convierten profármacos, y citocinas (por ejemplo, gamma interferón, IL-2, IL-12, e IL-15). Los agentes patógenos pueden incluir virus (por ejemplo, VIH, HSV, HBV, HCV, HPV, y FIV), bacterias, parásitos, hongos y tumores.

Dentro de aspectos relacionados, la presente invención proporciona además vectores de suministro de genes que contienen una o más de las cajas de expresión aquí descritas. Los ejemplos representativos de vectores de suministro de genes incluyen plásmidos y vectores víricos recombinantes obtenidos de retrovirus, herpesvirus, poxvirus, adenovirus, AAV, parvovirus, alfavirus, polioma virus, y vesiculovirus.

Las cajas de expresión y vehículos de suministro de genes tal como aquí se describen, pueden transformarse, transfectarse o introducirse de otra forma dentro de una amplia diversidad de células huéspedes, incluyendo por ejemplo, una amplia diversidad de células de vertebrados (por ejemplo, células de mamíferos tales como humano, primate no humano, caballo, perro, ratón).

## ES 2 300 261 T3

Las cajas de expresión y vehículos de suministro de genes tal como se proporcionan aquí, pueden usarse para estimular una respuesta inmune dentro de un huésped deseado, comprendiendo la etapa general de administración a un animal de una caja de expresión o un vector de suministro de gen tal como se describen aquí, de manera tal que se genere una respuesta inmune.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la descripción detallada siguiente y a los dibujos adjuntos. Además, se establecen aquí diversas referencias, las cuales describen con mayor detalle ciertos procedimientos o composiciones (por ejemplo, constructos de ADN).

### 10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática de una clase de caja de expresión de ARNs que produce ARN con una horquilla.

La Figura 2 es una ilustración esquemática de una clase de caja de expresión de ARNs que produce ARN de doble hebra verdadera.

La Figura 3 es una ilustración esquemática de una clase de caja de expresión de ARNs que produce ARN circular.

La Figura 4 es una ilustración esquemática de vectores de ADN con cajas de expresión de ARN de doble hebra y de antígeno.

Las Figuras 5A y 5B son ilustraciones esquemáticas de vectores de plásmidos con cajas pro-apoptóticas y de antígeno.

La Figura 6 describe diversos sitios de escisión diana en ARNm de Cox2, IRF2, YY1 y IL-10.

### Descripción detallada de la invención

#### 30 *Definiciones*

Antes del establecimiento de la invención, puede ser útil un conocimiento de la misma para establecer, en primer lugar, las definiciones de ciertos términos que se usarán aquí más adelante.

“*Caja de expresión*” se refiere a una unidad de transcripción que comprende un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico, de manera tal que dicha transcripción a partir del promotor da como resultado la síntesis de un ARN que corresponde a la molécula de ácido nucleico. La caja de expresión puede comprender además un sitio de terminación de transcripción y/o de poliadenilación.

“*Molécula de ácido nucleico aislada*” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo o células obtenidas de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un gen que ha sido separada del ADN genómico de una célula eucariótica es una molécula de ADN aislada. Otros ejemplos de moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas, y moléculas de ácido nucleico que han sido obtenidas por medios recombinantes (por ejemplo, PCR).

“*Huésped recombinante*” se refiere a cualquier célula procariótica o eucariótica que contenga o bien un vector de suministro de genes o bien un vector de expresión. Este término incluye igualmente aquellas células procarióticas o eucarióticas que han sido manipuladas genéticamente para contener los genes clonados en el cromosoma o genoma de la célula huésped.

Un “*oligonucleótido antisentido*” o “*molécula antisentido*” se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar un triplex estable con una porción del gen, o (b) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm.

“*Ribozima*” se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de escindir una secuencia de ácido ribonucleico específico. Los ribozimas pueden estar compuestos de ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos (por ejemplo, fosforotioatos), o cualquier combinación de estos (por ejemplo, ADN/ARN quiméricos). Dentro de realizaciones particularmente preferidas, un ribozima debería entenderse que se refiere a moléculas de ARN que contienen secuencias antisentido para reconocimiento específico, y una actividad enzimática de escisión de ARN.

“*Gen de ribozima*” se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) constituida por la secuencia de ribozima, la cual, cuando se transcribe dentro de ARN, proporcionará el ribozima.

“*Promotor*” es una secuencia de nucleótido que dirige la transcripción de un gen o ARN que codifica una proteína. Típicamente, un promotor se localiza en la región 5' adyacente a la secuencia que codifica un gen o ARN que ha de expresarse, y próximo al sitio de inicio de la transcripción. Si un promotor es un promotor inducible, en ese caso, el nivel de transcripción se incrementa en respuesta a un agente de inducción.

“*Vector de suministro de gen o GDV*” es un vehículo para el suministro de secuencias de ácido nucleico a las células. Los GDV incluyen vectores víricos, vectores de ácido nucleico tales como plásmidos, moléculas de ácido nucleico desprotegidas tales como ADN o ARN, moléculas de ácido nucleico acomplejadas a uno o más moléculas policatiónicas capaces de neutralizar parte o la totalidad de la carga negativa sobre una molécula de ácido nucleico y de condensar la molécula de ácido nucleico en una estructura compacta, ácido nucleico asociado con liposomas, bacterias, y ciertas células eucarióticas tales como células productoras, capaces de suministrar una molécula de ácido nucleico que tiene una o más propiedades deseables para las células huéspedes en un organismo. Tal como se expone más adelante, las propiedades deseables incluyen la capacidad para expresar una sustancia deseada, tal como una proteína (por ejemplo, una enzima, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, factor regulador, ligando) o molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ARN antisentido, ARN con sentido, ribozima), en la que la molécula de ácido nucleico portada por el GDV puede ser ella misma el agente activo sin que requiera la expresión de una sustancia deseada. Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico es una molécula antisentido que se une a ARNm e inhibe la traducción. Otro ejemplo, es aquel en el que la molécula de ácido nucleico contiene el código de un ribozima que se une y escinde el ARN, inhibiendo, de esta forma, la traducción.

“*Vector retrovívico recombinante*” se refiere a un vector de suministro de gen que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o secuencias de un gen o genes de interés. Preferiblemente, el vector retrovívico recombinante debería incluir un 5’LTR, u sitio de unión de ARNt, una señal de encapsidación, una o más secuencias heterólogas, un origen de síntesis de ADN de segunda hebra y un 3’ LTR. Igualmente, el vector retrovívico recombinante puede incluir un promotor/potenciador de transcripción, u otros elementos que controlan la expresión del gen por medios tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación post-transcripción de mensajero, o modificación post-transcripción de proteína. Opcionalmente, el vector retrovívico recombinante puede incluir igualmente marcadores seleccionables que confieran, a la célula transducida o transfectada, resistencia o sensibilidad a uno o más compuestos.

La presente invención se refiere a la introducción de secuencias de ácido nucleico dentro de un vertebrado para lograr la expresión de ARN que estimule directa o indirectamente de uno o más compuestos la respuesta inmune. Las moléculas pueden expresarse a partir de cualquiera de entre un cierto número de sistemas de suministro diferentes, bien solos o bien co-expresados con u polipéptido antigénico o terapéutico.

De acuerdo con ello, la presente invención puede ser usada para una diversidad de fines terapéuticos, incluyendo por ejemplo, para el fin de vacunación profiláctica o terapéutica, y para otras aplicaciones de terapia de genes. Con el fin de un conocimiento adicional de las invenciones aquí proporcionadas, se proporciona una exposición más detallada de (A) cajas de expresión; (B) generación de vectores de suministro de genes; y (C) procedimientos para el uso de cajas de expresión y vectores de suministro de genes para una diversidad de aplicaciones (por ejemplo, para un fin terapéutico, o, para uso en trabajos de laboratorio).

#### A. Generación de cajas de expresión

Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona una diversidad de cajas de expresión que dirigen la generación de ARN, así como opcionalmente, un gen seleccionado de interés, lo que incrementa, potencia, o estimula una respuesta inmune. Tal como se describe con mayor detalle más adelante, las cajas de expresión (que comprenden un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico de interés) pueden generarse para expresar ARN de doble hebra, ribozimas y ARN antisentido, así como antígenos o polipéptidos terapéuticos de interés. Cada uno de estos se expone con mayor detalle más adelante.

En resumen, mediante el uso de las cajas de expresión y/o vectores de suministro de genes aquí descritos, puede producirse ARN de doble hebra (ARNds) intracelularmente para una diversidad de aplicaciones. La presencia intracelular de ARNds induce la síntesis de interferones  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ; interferón Tipo I: IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ; interferón Tipo II: IFN- $\gamma$ ). La producción de interferones de Tipo I y II, a su vez, induce tanto una respuesta inmune específica del antígeno como no específica del antígeno, estimulando directamente linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, células asesinas (NK) naturales, y monolitos/macrófagos. Además, estos interferones potencian la presentación de antígeno a través de la expresión incrementada de MHC de clase I y clase II sobre la superficie de la célula. En la presente invención se proporcionan composiciones y procedimientos para la expresión de ARNds no codificante en el contexto de expresión de un antígeno deseado. La expresión de ARNds de acuerdo con la invención potencia la robustez general de las respuestas inmunes específicas del antígeno.

La inducción de interferones de Tipo I y II, como un resultado de la presencia intracelular de ARNds, induce, a su vez, la síntesis de proteína quinasa R (PKR), y 2’,5’-oligoadenilato sintetasa (2,5’ OAS) (Jacobs y Langland, *Virology*, vol. 219, págs. 339-349, (1996)). La activación de PKR y 2’,5’ OAS puede conducir, a su vez, a la apoptosis en una célula dada, cuando la relación de agonistas muertos, por ejemplo Bax y Bak, a antagonistas muertos, por ejemplo Bcl-2, excede de la unidad (para revisiones, véase Kroemer, *Nat. Med.*, vol. 6, págs. 614-620, (1997); y Adams y Cory, *Science*, vol. 281, págs. 1322-1326, (1998)). La PKR activada puede producir directamente esta relación a través de la fosforilación e inactivación del factor de traducción eif-2 $\alpha$  e I $\kappa$ B. La fosforilación de I $\kappa$ B mediante PKR puede conducir a la degradación de I $\kappa$ B y subsiguiente activación de NF- $\kappa$ B (Maran, *Virology*, vol. 164, págs. 106-113, (1994)). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que activa la transcripción de genes para citocinas inflamatorias, incluyendo TNF $\alpha$  (Gilmore, *Cancer Biol.*, vol. 8, págs. 61-62, (1997)). La inducción de TNF $\alpha$  puede inducir la apoptosis a través de la vía dependiente de caspasa sensible de CmA/P35 (Thomberry y Lazebnik, *Science*, vol. 281, págs. 1312-1316, (1998)).

La inducción de interferones de Tipo I y II y la apoptosis en el contexto de la expresión de antígeno potencia la respuesta inmune específica, a través de el cebado eficaz de, por ejemplo, células dendríticas (DCs). Como células que presentan antígenos, las CD<sub>s</sub> fagocitan células apoptóticas, y procesan antígenos dentro de péptidos en el citosol, que, a su vez, se une a péptidos MCH de clase I o clase II, y son presentadas a linfocitos T (Banchereau y Steinman, *Nature*, vol. 392, págs. 245-252, (1998)). La inducción de la apoptosis, o la vía de la muerte, en el contexto de la expresión de antígeno con el fin de potenciar la respuesta inmune, puede llevarse a cabo por una diversidad de procedimientos diferentes incluyendo, por ejemplo, la expresión de o bien genes dependientes de caspasa o bien independientes de caspasa, o la expresión de receptores de muerte (por ejemplo, CD95 o TNFR1).

Los ejemplos representativos de cajas de expresión adecuadas se describen con mayor detalle más adelante, así como en las figuras (véanse Figuras 1-3 para ilustraciones esquemáticas de cajas de expresión que crean ARNs a través del uso de horquillas (Figura 1), ARNs verdadero (Figura 2) y ARN circular (Figura 3).

A partir de las cajas de expresión y/o los vectores de suministro de genes pueden expresarse una amplia diversidad de moléculas de ácido nucleico. Estas incluyen (1) ARN antisentido; (2) ribozimas; (3) polipéptidos, incluyendo antígenos y proteínas terapéuticas, y polipéptidos apoptóticos.

### 1. ARN antisentido

Dentro de una realización de la invención, se proporcionan sistemas de suministro que producen una secuencia de ARN antisentido tras la introducción dentro de una célula huésped. En resumen, el arco de secuencias de ARN antisentido diseñadas para unirse a transcritos de ARN diana y, de esta forma, prevenir la síntesis celular de una proteína particular o prevenir el uso de dicha secuencia de ARN por la célula. En realizaciones preferidas, los transcritos de ARN codifican productos de genes que controlan o regulan diversos aspectos de la respuesta inmune o de la vía apoptótica.

Las secuencias antisentido de la presente invención pueden ser de una diversidad de tamaños, incluyendo por ejemplo de 40, 60, 100, 250, 500, o incluso 1000 nucleótidos. Para realizaciones preferidas, la secuencia antisentido es menor de 100 nucleótidos. La secuencia antisentido puede ser igualmente 100% complementaria a la secuencia diana, o puede contener una o más "diferencias" que no son complementarias, siempre y cuando que el ARN antisentido mantenga su capacidad para unir la secuencia diana bajo las condiciones fisiológicas del huésped.

Los ejemplos representativos de dichas secuencias antisentido adecuadas para uso dentro de la presente invención, incluyen IRF2, YYK1, Cox2, IL-10, Bcl-2, Bcl-xl, y TGF- $\beta$  antisentido. La secuencia antisentido puede ser igualmente un ARN antisentido complementario a secuencias de ARN necesarias para la patogenicidad. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico activa biológicamente puede ser un ARN (o ADN) con sentido complementario a secuencias de ARN necesarias para la patogenicidad.

### 2. Ribozimas

Los sistemas de suministro pueden producir ribozimas tras la introducción dentro de una célula huésped. En resumen, los ribozimas son moléculas de ARN usadas para escindir ARNs específicos y están diseñadas de manera tal que pueden afectar únicamente a una secuencia de ARN específica. Generalmente, el substrato que une la secuencia de un ribozima está comprendida típicamente dentro de una longitud de 10 y 20 nucleótidos, aunque pueden usarse igualmente secuencias más largas. La longitud de esta secuencia es suficiente para permitir la hibridación con el ARN diana y la disociación de la ribozima del ARN escindido. Pueden construirse diversos tipos diferentes de ribozimas incluyendo, por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo (Rossi, J.J. y otros, *Pharmac. Ther.*, vol. 50, págs. 245-254, (1991)) (Foster y Symons, *Cell*, vol. 48, págs. 211-220, (1987); Haseloff y Gerlach, *Nature*, vol. 328, págs. 596-600, (1988); Walbot y Bruening, *Nature*, vol. 334, pág. 196, (1988); Haseloff y Gerlach, *Nature*, vol. 334, pág. 585, (1988), y patente de EE.UU. No. 5.254.678), ribozimas de horquilla (Hampel y otros, *Nucl. Acids Res.*, vol. 18, págs. 299-304, (1990), y patente de EE.UU. No. 5.245.678), ribozimas del virus delta de la hepatitis (Perrotta y Been, *Biochem.*, vol. 31, pág. 16, (1992), ribozimas de intrón Grupo I (Cech y otros, patente de EE.UU. No. 4.987.071) y ribozimas RNase P (Takada y otros, *Cell*, vol. 35, pág. 849, (1993); véase, igualmente, patente WO 95/29241, titulada "Ribozimas con eyección de producto mediante desplazamiento de hebra", y la patente WO 95/31551, titulada "Nuevas moléculas de ARN enzimático". (Véanse, igualmente, las patentes de EE.UU. Nos. 5.116.742; 5.225.337 y 5.246.921). Los ribozimas preferidos pueden incluir aquellos que identifican transcritos de ARN que codifican productos de genes que controlan o regulan diversos aspectos de la respuesta inmune o la vía apoptótica. Los ribozimas particularmente preferidos se describen con mayor detalle más adelante.

### 3. Co-expresión de antígenos, polipéptidos terapéuticos, y genes apoptóticos

Además de los ARNs inmunoestimuladores de la presente invención, pueden incluirse una amplia diversidad de genes que codifican polipéptidos antigénicos o terapéuticos, o bien mediante co-expresión a partir de un vector o bien co-administración de vectores separados, incluyendo por ejemplo, secuencias que codifican paliativos tales como linfocinas, toxinas, o profármacos, antígenos que estimulan una respuesta inmune, y proteínas que modulan la respuesta inmune o la vía apoptótica. Los sistemas de suministro pueden contener genes para dos o más polipéptidos antigénicos o terapéuticos.

## a. Antígenos

Dentro de la presente invención, se proporcionan constructos que dirigen la expresión de porciones inmunogénicas de antígenos a partir de organismos extraños u otros agentes patógenos (por ejemplo, células cancerosas). Los antígenos de vacuna preferidos a partir de organismos extraños son aquellos que protegen a los animales de sangre caliente de enfermedades causadas por agentes infecciosos, tales como bacterias, hongos, parásitos y virus.

Los ejemplos representativos de dichos antígenos particularmente relevantes para vacunas humanas incluyen: antígenos víricos procedentes de arnavirus tales como virus de la fiebre de Lassa; rotavirus; adenovirus; papilomavirus humano; retrovirus tales como VIH, HTLV-I y -II; virus del herpes tal como virus del herpes simple, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus varicela-zoster, y virus 6 del herpes humano; picornavirus tales como poliovirus, rinovirus humano, y virus de la hepatitis A; togavirus tales como encefalitis equina de Venezuela, y virus rubela; virus de la hepatitis B; flavivirus tales como virus del dengue, virus de la encefalitis asociada con garrapatas, y virus de la hepatitis C; coronavirus humano; rhabdovirus tales como virus de la rabia, y virus de la estomatitis vesicular; filovirus tales como virus Ebola y virus Marburg; paramixovirus tales como virus de la parainfluenza humano, virus de la parotiditis, virus sincitial respiratorio, y virus del sarampión; virus influenza; bunyavirus tales como virus Hantaan, y virus de la fiebre del Valle de Rift; antígenos bacterianos (por ejemplo, procedentes de *E. coli*, estreptococos, estafilococos, micobacterias; meningococos o helicobacter), antígenos fúngicos y antígenos parasíticos (por ejemplo, procedentes de *Leishmania* o malaria).

Los ejemplos representativos de antígenos particularmente relevantes para aplicaciones veterinarias se obtienen de *Toxoplasma*, *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema*, *Babesia*, *Brugia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cryptosporidium*, *Dipetalonema*, *Eimeria*, *Encephalitozoon*, *Hepatozoon*, *Histoplasma*, *Isospora*, *Loa*, *Microsporidia*, *Neospora*, *Nosema*, *Onchocerca*, *Parafilaria*, *Plasmodium*, *Pneumocystis*, *Rochalimaea*, *Setaria*, *Stephanofilaria*, *Theileria*, *Toxoplasma*, y *Wuchereria*, virus tales como equino, virus del herpes, virus de la rinotraqueítis felina, rotavirus porcino, virus de la lengua azul, FIV, FeLV, BIV, papilomavirus bovino EIAV, parvovirus canino, virus de la panleucopenia felina, virus de la glosopeda, enterovirus porcino, TGEV, virus de la peritonitis infecciosa felina, coronavirus bovino, virus de la rabia, virus del moquillo canino.

“Porción inmunógena” se refiere a una porción del antígeno respectivo que es capaz, bajo las condiciones apropiadas, de inducir una respuesta inmune (por ejemplo, mediada por células o humoral). Las “porciones” pueden ser de tamaño variable, pero preferiblemente son de una longitud de al menos 9 aminoácidos, y pueden incluir el antígeno entero.

## b. Polipéptidos terapéuticos

Las cajas de expresión y los vectores de suministro de genes pueden dirigir la expresión de un producto de gen que activa un compuesto con poca o nula citotoxicidad dentro de un producto tóxico. En resumen, pueden usarse una amplia variedad de productos de genes que o bien directamente o bien indirectamente activan un compuesto con poca o nula citotoxicidad dentro de un producto tóxico. Los ejemplos representativos de dichos productos de genes incluyen HSVTK y VZVTK, los cuales monofosforilan de manera selectiva ciertos arabinosidos de purina y compuestos pirimidino substituidos, convirtiéndolos a metabolitos citotóxicos o citostáticos. Más específicamente, la exposición de los fármacos ganciclovir, acyclovir, o cualquiera de sus análogos (por ejemplo, FIAC, DHPG) a HSVTK, fosforilan el fármaco en su forma nucleótido trifosfato activa correspondiente.

Otros polipéptidos terapéuticos que pueden expresarse a partir de las cajas y los vectores de suministro de genes, incluyen citocinas, tales como IL-1, IL-2 (Karupiah y otros, *J. Immunology*, vol. 144, págs. 290-298, (1990); Weber y otros, *J. Exp. Med.*, vol. 166, págs. 1716-1733, (1987); Gansbacher y otros, *J. Exp. Med.*, vol. 172, págs. 1217-1224, (1990); patente de EE.UU. No. 4.738.927), IL-3, IL-4 (Tepper y otros, *Cell*, vol. 57, págs. 503-512, (1989); Golumbek y otros, *Science*, vol. 254, págs. 713-716, (1991); patente de EE.UU. No. 5.017.691), IL-5, IL-6 (Brakenhof y otros, *J. Immunol.*, vol. 139, págs. 4116-4121, (1987); patente WO 90/06370), IL-7 (patente de EE.UU. No. 4.965.195), IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 (*Cytokine Bulletin*, Summer 1994), IL-14 e IL-15, particularmente IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, e IL-13, alfa interferón (Finter y otros, *Drugs*, vol. 42, (No. 5), págs. 749-765, (1991); patente de EE.UU. No. 4.892.743; patente de EE.UU. No. 4.966.843; patente WO 85/02862; Nagata y otros, *Nature*, vol. 284, págs. 316-320, (1980); Familletti y otros, *Methods in Enz.*, vol. 78, págs. 387-394, (1981); Twu y otros, *PNAS*, vol. 86, págs. 2046-2050, (1989); Faktor y otros, *Oncogene*, vol. 5, págs. 867-872, (1990); beta interferón (Seif y otros, *J. Virol.*, vol. 65, págs. 664-671, (1991), gamma interferones (Radford y otros, *The American Society of Hepatology*, págs. 2008-2015, (1991); Watanabe y otros, *PNAS*, vol. 86, págs. 9456-9460, (1089); Gansbacher y otros, *Cancer Research*, vol. 50, págs. 7820-7825, (1990); Maio y otros, *Can. Immunol. Immunother.*, vol. 30, págs. 34-42, (1989); patente de EE.UU. No. 4.762.791; patente de EE.UU. No. 4.727.138), G-CSF (patentes de EE.UU. Nos. 4.999.291 y 4.810.643), GM-CSF (patente WO 85/04188), factores de necrosis de tumor (TNFs) (Jayaraman y otros, *J. Immunology*, vol. 144, págs. 942-951, (1990), CD3 (Krissanen y otros, *Immunogenetics*, vol. 26, págs. 258-266, (1987), ICAM-1 (Altman y otros, *Nature*, vol. 338, págs. 512-514, (1989); Simmons y otros, *Nature*, vol. 331, págs. 624-627, (1988), ICAM-2, LFA-1, LFA-3 (Wallner y otros, *J. Exp. Med.*, vol. 166, (No. 4), págs. 923-932, (1987), moléculas MHC clase I, moléculas MHC clase II, B7.1-.3, b<sub>2</sub>-microglobulina (Parnes y otros, *PNAS*, vol. 78, págs. 2253-2257, (1981), acompañantes tales como calnixin, MCH ligadas a transportadores de proteínas o análogos de las mismas (Powis y otros, *Nature*, vol. 354, págs. 528-531, (1991).

### c. *Genes apoptóticos*

La apoptosis es el proceso normal de muerte celular programado, que mantiene la homeostasia del tejido (Kerr, J.F. y otros, *Br. J. Cancer*, vol. 26, págs. 239-257, (1972)). El proceso de apoptosis está regulado por señales generadas cuando las citocinas se unen a sus receptores, lo cual puede producir, a su vez, o bien señales inductivas o bien inhibidoras que regulan el procesos apoptótico. Tras la inducción de la apoptosis se produce una cascada de activación de zimógeno, lo cual eventualmente conduce a la activación de nucleasas endógenas que escinden la cromatina entre nucleosomas y reducen el contenido de ADN intacto en células apoptóticas, conduciendo, de esta forma, a la muerte celular. Aunque la apoptosis está mediada por una diversidad de señales e interacciones complejas de productos de genes celulares, los resultados de estas interacciones desembocan finalmente en una vía de muerte celular que es, por sí misma, una cascada de activación de zimógeno (es decir, episodios proteolíticos) análogos a los de la cascada de coagulación de la sangre.

Actualmente se han identificado diversas familias de genes y productos que modulan el proceso apoptótico. Una de dichas familias es la familia Bcl-2, la cual incluye proteínas inhibidoras de la muerte celular Bcl-2, Bcl-xL, y CED-9 así como proteínas que promueven la apoptosis bax, bak, bcl-xS, y bad. La Bcl-2 fue el primer componente reconocido de muerte celular programada (Tsujimoto y otros, *Science*, vol. 228, págs. 1440-1443, (1985); Nunez y otros, *J. Immunol.*, vol. 144, págs. 3602-3610, (1990); Reed, *Nature*, vol. 387, pág. 773, (1997)).

En resumen, la Bcl-2 y su homóloga Bcl-xL son antagonistas de muerte que se asocian fundamentalmente con la membrana mitocondrial exterior, el retículo endoplásmico, y la envoltura nuclear y, más aún, han documentado actividad del canal de iones (Reed, *Nature*, vol. 387, pág. 773, (1997)). Estas proteínas pueden prevenir la apoptosis regulando la homeostasia eléctrica y osmótica del mitocondria, un proceso que es necesario para prevenir el hinchamiento mitocondrial, la rotura de la membrana exterior, y la subsiguiente liberación del citocromo c (Heiden y otros, *Cell*, vol. 91, págs. 627-637, (1997)). La liberación del citocromo c a partir del mitocondria se estima que es el episodio que inicia la cascada cisteína proteasa de muerte celular, a través de la formación del complejo Apaf-1/caspasa-9/citocromo c (Li y otros, *Cell*, vol. 91, págs. 479-489, (1997); Reed, *Cell*, vol. 91, págs. 559-562, (1997)). Este complejo en combinación con dATP conduce, a su vez, a la activación proteolítica del zimógeno caspasa-9, que inicia, de esta manera, la cascada proteolítica.

Las cisteína proteasas responsables de esta cascada son cisteína proteasas específicas del aspartato y se hace referencia a ellas de manera colectiva como proteínas "caspasa". El primer miembro de la familia caspasa se identificó como Enzima de Conversión de Interleuquina-1 $\beta$  (ICE), la cual se encontró que estaba estructural y funcionalmente relacionada con la CED-3 proteasa que funciona como un efector de muerte celular en el gusano redondo *C. elegans* (Yuan y otros, *Cell*, vol. 75, pág. 641, (1993)). Después de este descubrimiento se han identificado muchos otros miembros de la familia ICE/CED-3 e incluyen, por ejemplo, ICE humano (enzima de conversión de interleuquina-1 $\beta$ ) (caspasa-1), ICH-1 (caspasa-2), CPP32 (caspasa-3), ICE<sub>rel</sub>II (caspasa-4), ICE<sub>rel</sub>III (caspasa-5), Mch2 (caspasa-6), ICE-LAP3 (caspasa-7), Mch5 (caspasa-8), ICE-LAP6 (caspasa-9), Mch4 (caspasa-10), y otros.

Dado que el proceso apoptótico funciona para mantener la homeostasis del tejido, pueden asociarse una diversidad de estados patológicos con la regulación apoptótica anormal. Además, la pérdida o inhibición de la apoptosis puede conducir a la acumulación de células infectadas víricamente o a células hiperproliferativas tales como células de tumores. De manera similar, la inapropiada activación de la apoptosis puede contribuir igualmente a una diversidad de estados de enfermedades patológicas incluyendo, por ejemplo, lesión isquémica. De acuerdo con ello, los tratamientos que han sido específicamente diseñados para modular las vías apoptóticas en estas y otras afecciones patológicas pueden alterar la progresión natural de muchas de estas enfermedades.

#### 4. *Obtención de una molécula de ácido nucleico de interés*

Las secuencias que codifican las secuencias antisentido o ribozimas, antígenos, polipéptidos terapéuticos y genes apoptóticos anteriormente descritos, pueden generarse de manera sintética o recombinante, u obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo por ejemplo, la de depositarios tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican dichos antígenos son generadas fácilmente por un experto en la técnica usando metodologías mediante PCR convencionales, siempre y cuando se encuentren disponibles al menos algunos datos de la secuencia. Como alternativa, las secuencias de ADNc que codifican los antígenos anteriormente descritos pueden obtenerse a partir de células o cultivos que expresan o contienen las secuencias. En resumen, el ARNm procedente de una célula que expresa el gen de interés puede transcribirse de forma inversa con transcriptasa inversa usando oligonucleótido dT o cebadores aleatorios. A continuación, el ADNc monohebra puede amplificarse mediante PCR. (véanse las Patentes de EE.UU. Nos. 4.683.202; 4.683.195 y 4.800.159. Véase, igualmente, *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, Erlich (ed.), Stockton Press, (1989)) usando cebadores oligonucleótidos complementarios a las secuencias sobre cada lado de las secuencias deseadas. En particular, puede desnaturalizarse un ADN de doble hebra mediante calentamiento en la presencia de una Taq polimerasa térmicamente estable, cebadores de ADN específicos de la secuencia, dATP, dCTP, dGTP y dTTP. El ADN de doble hebra se produce cuando se completa la síntesis. El ciclo puede repetirse muchas veces, dando como resultado una amplificación factorial del ADN deseado.

Las secuencias que codifican los antígenos anteriormente descritos pueden sintetizarse, igualmente, por ejemplo, sobre un sintetizador de ADN de Applied Biosystems Inc. (Applied Biosystems, Foster City, CA).



## B. Preparación de vectores de suministro de genes

Para contener y expresar las cajas de expresión aquí descritas, pueden usarse una amplia variedad de vectores de suministro de genes. El vector de suministro de genes puede ser de origen o bien vírico o bien no vírico (véase, de manera general, Jolly, *Cancer Gene Therapy*, vol. 1, págs. 51-64, (1994); Kimura, *Human Gene Therapy*, vol. 5, págs. 845-852, (1994); Connelly, *Human Gene Therapy*, vol. 6, págs. 185-193, (1995); y Kaplitt, *Nature Genetics*, vol. 6, págs. 148-153, (1994); Donnelly y otros, véase cita anterior). Los vehículos de terapia de genes para suministro de constructos que incluyen una secuencia de codificación de una terapéutica de la invención, pueden administrarse o bien localmente o bien sistémicamente (por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, intradérmicamente, subcutáneamente, intratumoralmente, intranasalmente, oralmente, intrahepáticamente, intratraquealmente). Estos constructos pueden usar vías de vector vírico o no vírico tanto en la modalidad *in vivo* como *ex vivo*. La expresión de dicha secuencia de codificación puede inducirse usando promotores heterólogos o mamíferos endógenos. La expresión de la secuencia de codificación *in vivo* puede ser o bien constitutiva o bien regulada tal como se describe en detalle más adelante.

Dentro de un aspecto de la presente invención, el vector de suministro de gen es un vector con base de plásmido. Los ejemplos representativos de vectores adecuados en este aspecto, incluyen los descritos dentro de la patente de EE.UU. No. 5.580.859 titulada "Suministro de secuencias de ADN exógeno en un mamífero", la patente de EE.UU. No. 5.589.466 titulada "Inducción de una respuesta inmune protectora en un mamífero mediante inyección de una secuencia de ADN", las patentes de EE.UU. Nos. 5.688.688, 5.814.482 y 5.580.859, y Donnelly y otros, véase cita anterior).

Dentro de otros aspectos de la presente invención, los vectores de suministro de genes pueden generarse basados en un retrovirus. En resumen, los vectores de suministro de genes retrovíricos de la presente invención pueden construirse fácilmente a partir de una amplia variedad de retrovirus, incluyendo, por ejemplo, retrovirus del tipo B, C y D así como espumavirus y lentivirus (véase *RNA Tumor Viruses*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, (1985)). Dichos retrovirus pueden obtenerse fácilmente a partir de depositarios o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC", Rockville, Maryland), o aislarse a partir de fuentes conocidas que usan técnicas comúnmente disponibles. Los ejemplos representativos de vectores de suministro de genes retrovíricos están descritos con mayor detalle en la patente EP 0.415.731; las publicaciones PCT Nos. WO 90/07936; WO 91/0285; WO 9311230; WO 9310218; WO 9403622; WO 9325698; WO 9325234; y las patentes de EE.UU. Nos. 5.219.740, 5.716.613, 5.851.529, 5.591.624, 5.716.826, 5.716.832, y 5.817.491.

Otros vectores de suministro de genes adecuados pueden generarse a partir de alfavirus (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.091.309 y 5.217.879, 5.843.723, y 5.789.245), vectores adenovíricos recombinantes (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.872.005), y otros numerosos virus tales como poxvirus, tal como poxvirus canario o virus vaccinia (Fisher-Hoch y otros, *PNAS*, vol. 86, págs. 317-321, (1989); Flexner y otros, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 569, págs. 86-103, (1989); Flexner y otros, *Vaccine*, vol. 8, págs. 17-21, (1990); patentes de EE.UU. Nos. 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; patente WO 89/01973); vectores adeno-asociados (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. No. 5.872.005); SV40 (Mulligan y otros, *Nature*, vol. 277, págs. 108-114, (1979)); herpes (Kit, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 215, págs. 219-236, (1989); patente de EE.UU. No. 5.288.641); y lentivirus tal como VIH (Poznansky, *J. Virol.*, vol. 65, págs. 532-536, (1991) o FIV).

## C. Procedimientos de estimulación de una respuesta inmune

La capacidad para reconocer y defenderse contra agentes patógenos es un aspecto central de la función del sistema inmune. Este sistema, a través del reconocimiento inmune, debe ser capaz de distinguir "propio" de "no propio" (extraño), lo cual es esencial para asegurar que los mecanismos defensivos están dirigidos hacia la invasión de entidades más que contra tejidos huéspedes. Las características fundamentales del sistema inmune son la presencia de estructuras de reconocimiento de superficies de células altamente polimórficas (receptores) y mecanismos efectores (anticuerpos y células citolíticas) para la destrucción de patógenos invasores.

Los linfocitos T citolíticos o citotóxicos (CTL) están normalmente inducidos por la manifestación de péptidos específicos de patógenos procesados conjuntamente con las proteínas de superficie de célula MHC de clase I o clase II. Igualmente estimulada por este tipo de presentación de antígeno se encuentra la generación y producción de anticuerpos, células ayudantes y células de memoria. Dentro de una realización de la presente invención, la presentación de determinantes víricos inmunógenos en el contexto de moléculas MHC apropiadas induce de manera eficaz respuestas de CTL óptimas sin la exposición del paciente al patógeno. Esta vía vector para la estimulación inmune proporciona un medio más eficaz de inducción de respuestas potentes de CTL protectoras y terapéuticas restringidas a la clase I, dado que el tipo de inmunidad inducida por el vector se parece de manera más íntima a la inducida por exposición a la infección natural. En base al conocimiento actual de diversos sistemas víricos, es improbable que los antígenos víricos no replicantes, suministrados exógenamente, tales como péptidos y proteínas recombinantes purificadas, proporcionarían un estímulo suficiente como para inducir respuestas óptimas de CTL restringidas a la clase I. Como alternativa, la expresión suministrada por vectores de proteínas víricas seleccionadas u otros antígenos que corresponden a una afección patógena, tal como el cáncer, dentro de las células diana tal como se describe dentro de la presente invención, proporciona un estímulo de este tipo.

A modo de ejemplo, en el caso de infecciones por VIH-1, los pacientes desarrollan anticuerpos específicos para una diversidad de determinantes de la región de envoltura vírica, algunos de los cuales son capaces de neutralización del virus *in vitro*. Sin embargo, la progresión de la enfermedad continúa y los pacientes sucumben eventualmente a la enfermedad. Las respuestas de CTL de bajo nivel contra células de pacientes infectados (Plata y otros, *Nature*, vol. 328, págs. 348-351, (1987)) y contra células diana infectadas con vectores de vaccinia recombinante que expresan VIH gag, pol o env (Walker y otros, *Nature*, vol. 328, págs. 345-348, (1987); Walter y otros, *Science*, vol. 240, págs. 64-66, (1988)) han sido detectadas en algunos pacientes seropositivos de VIH-1. Además, recientemente se ha mostrado que los CTL tanto murinos como humanos pueden ser inducidos por células estimuladoras autólogas que expresan VIH gp 120 vía transfección (Langlade-Demoyan y otros, *J. Immunol.*, vol. 141, pág. 1949, (1988)). La inducción mejorada de CTL podría ser terapéuticamente ventajosa para pacientes infectados y proporcionar una terapia preventiva eficaz a individuos bajo condiciones no infecciosas. La propia infección por VIH puede que no produzca una respuesta adecuada de CTL debido a que otros elementos asociados con la infección por VIH pueden prevenir una adecuada estimulación inmune. Además, puede ser que la estimulación de células T por células infectadas sea una interacción que conduzca a la infección de las células T estimuladas.

El VIH es solamente un ejemplo. Esta vía puede ser eficaz contra muchas enfermedades ligadas víricamente o cánceres, en las cuales se expresa un antígeno característico (el cual no necesita ser una proteína de membrana), tal como en HPV y carcinoma cervical, leucemias inducidas por HTLV-1, antígeno específico de la próstata (PSA) y cáncer de próstata, carcinoma de colon y p53 mutado, melanoma y antígeno GD2.

### 1. *Administración in vivo*

Dentro de ciertos aspectos de la presente invención, se proporcionan procedimientos para el suministro de una o más secuencias de nucleótidos a un animal de sangre caliente, que comprenden la etapa de administración al animal de sangre caliente de un vector de suministro de gene, tal como ADN plásmido, vector retrovirus, vector adenovirus, vector AVV, vector poxvirus, vector herpesvirus, vector alfavirus, y sistema de iniciación de vector extendido en capas eucariótico, que expresa la secuencia nucleotídica tal como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de suministro de genes pueden administrarse a los animales de sangre caliente o bien directamente ((por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, oralmente, rectalmente, intraocularmente, intranasalmente, intradérmicamente, intratumoralmente), o bien mediante diversos procedimientos físicos tales como lipofección (Felgner y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, págs. 7413-7417, (1989)), inyección directa de ADN (Acsadi y otros, *Nature*, vol. 352, págs. 815-818, (1991)); bombardeo con microproyectiles (Williams y otros, *PNAS*, vol. 88, págs. 2726-2730, (1991)); liposomas de diversos tipos (véase, por ejemplo, Wang y otros, *PNAS*, vol. 84, págs. 7851-7855, (1987)); CaPO<sub>4</sub> (Dubensky y otros, *PNAS*, vol. 81, págs. 7529-7533, (1984)); ligando de ADN (Wu y otros, *J. of Biol. Chem.*, vol. 264, págs. 16985-16987, (1989)); administración de ácidos nucleicos solamente (patente WO 90/11092); o administración de ADN ligado a adenovirus muerto (Curiel y otros, *Human Gene Ther.*, vol. 3, págs. 147-154, (1992)); vía compuestos policationes tales como polilisina, que usan ligandos específicos del receptor; así como virus inactivados con psoraleno tal como Sendai o Adenovirus. Además, los sistemas de iniciación de vectores extendidos en capas eucarióticos pueden administrarse tanto directamente (es decir, *in vivo*), como a células que han sido extraídas (*ex vivo*), y posteriormente retornadas.

Dentro de una realización de la invención, la caja de expresión o vector de suministro de genes se suministra (tanto *in vivo* como *ex vivo*) a células dendríticas (DC). En resumen, las células dendríticas (DC) son células que presentan antígeno profesional, el cual inicia y modula la respuesta inmune. En particular, las DC son potentes estimuladores de linfocitos B y T (para una revisión, véase Branchereau y Steinman, *Nature*, vol. 392, págs. 245-252, (1998)). La estimulación de los efectores específicos del antígeno del linfocito T y B se produce por la presentación por las células de presentación del antígeno dendrítico, en el cual el antígeno procesado se manifiesta conjuntamente con moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de dos tipos de alternativos (MHC clase I, o MHC clase II), a linfocitos T, vía el receptor de antígeno de célula T. La presentación del antígeno vía MHC clase I da como resultado una respuesta de célula CD8+ (célula T citotóxica, CTL) celular, en tanto que la presentación del antígeno vía MHC clase II de cómo resultado la estimulación de células CD4+ y subsiguientemente linfocitos B, resultando una respuesta humoral (anticuerpo, Ab).

La presente invención se refiere de una manera amplia a composiciones y procedimientos para la estimulación de la respuesta inmune a través del uso de diversos ARN y otras moléculas sintetizadas *in vivo* a partir de una caja de expresión contenida dentro de un vehículo de suministro de gen apropiado. Tal como resultará evidente a partir de los ejemplos detallados más adelante, dichas moléculas de ARN inmunoestimulantes pueden comprender secuencias que forman estructuras de ARN de doble hebra (ds) dentro de una célula deseada, o bien mediante emparejamiento de bases con ARNs previamente presentes en la célula, o bien vía secuencias de auto-complementación dentro de la molécula de ARN expresada. La presencia de moléculas de ARNs de este tipo dentro de una célula conducirá, típicamente, a la inducción de uno o más elementos del sistema inmune, incluyendo respuestas de interferón. Además, las moléculas de ARN inmunoestimulantes pueden comprender igualmente secuencias antisentido o ribozima que específicamente identifican uno o más productos de genes celulares, de manera tal que la supresión o sub-regulación del producto de gen identificado da como resultado la sobre-regulación y expresión incrementada de un segundo producto de gen asociado con una respuesta inmune. Las moléculas de ARN de la presente invención pueden expresarse solas o co-expresarse con uno o más antígenos obtenidos de un agente patógeno (por ejemplo, agente infeccioso, cáncer), y son adecuadas para uso en una amplia diversidad de sistemas de suministro de genes, tales como ADN

plásmido, vectores retrovirus, vectores adenovirus, vectores AAV, vectores poxvirus, vectores herpesvirus, y vectores alfavirus.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Construcción de vectores de suministro de genes que sintetizan ARN de doble hebra en células transfectadas*

A continuación, se describe la construcción de vectores de suministro de genes que proporcionan una respuesta inmune potenciada a un antígeno deseado cuando se inoculan dentro de un animal de sangre caliente. Como un ejemplo, se ilustran plásmidos que expresan únicamente ARN de doble hebra que codifica una no proteína, o además, que expresa igualmente un antígeno deseado a partir de un agente patógeno.

#### *A. Cajas de expresión que transcriben ARNs de no codificación en células transfectadas*

En la presente invención, se proporcionan construcciones de cajas de expresión que transcriben ARNs de no codificación en células diana transfectadas *in vivo* (véanse Figuras 1-3). Como un ejemplo preferido, es la síntesis de ARNs a partir de una caja de expresión basada en un promotor ARN polimerasa III. No obstante, pueden sustituirse fácilmente otros promotores (por ejemplo, ARN polimerasa I y II). De acuerdo con ello, en células transfectadas *in vivo* con los constructos de ADN plásmido aquí descritos, se sintetizan niveles de ARNs que codifican una no proteína bien solos, o además de un antígeno deseado específico a partir de un agente patógeno. La expresión del ARNs da como resultado una respuesta inmune potenciada general al antígeno.

Específicamente, se construyó una caja de expresión de ARNs no codificante basada en el promotor ARN polimerasa III (pol III) (Figura 1) para contener los elementos ordenados siguientes: promotor de ARN de Adenovirus 2 VA1 (nucleótidos -70/+30), nucleótidos 447-547 del gen Rinovirus 1A 3C proteasa, en el cual se cambió el nucleótido A presente en un codón ATG en cualquier marco de lectura alternativo, una extensión de 10 nucleótidos de longitud de restos C, nucleótidos 447-547 del gen Rinovirus 1A 3C proteasa, en una orientación antisentido, y la secuencia de terminación de transcripción de consenso de ARN polimerasa III. Adicionalmente, se construyeron plásmidos los cuales contenían adicionalmente una caja de expresión de ARN polimerasa II (pol II) que expresa un antígeno (Figura 4), constituida por los elementos ordenados siguientes: promotor de CMV, intrón, gen heterólogo (lac Z o el gen de glicoproteína B procedente del virus del herpes simple tipo 1), y la secuencia de terminación de poliadenilación/transcripción de SV40. Se construyeron plásmidos en los cuales los productos de ARN transcritos a partir de las cajas de expresión pol II y pol III estuvieron en las mismas direcciones o en direcciones opuestas, en relación unas con otras. Estos elementos ordenados en las cajas de expresión pol II y pol III descritas anteriormente se clonaron dentro de un vector de ADN plásmido resistente a kanamicina obtenido de pUC para propagación en *E. coli*, tal como se describe más adelante, usando técnicas de ADN recombinante convencionales (Maniatis y Sambrook). Los plásmidos se construyeron sobre la estructura principal del vector pBGS131 (Spratt y otros, *Gene*, vol. 41, págs. 337-342, (1986); ATCC #37443), la cual se modificó para separar secuencias extrañas, para insertar un sitio de clonación múltiple alterno (*PmeI-BglIII-XhoI-NotI-EcoRI-PmeI*), y para volver no funcional un sitio *XhoI* existente dentro del gen de resistencia a la kanamicina. Este vector modificado se conoce como pBGSVG y ha sido ya descrito anteriormente (patente WO 97/38087).

Para la expresión de genes que codifican los antígenos deseados, se insertó la caja de ARN polimerasa II procedente del vector pCI (Promega, Madison, WI) dentro del vector plásmido pBGSVG, descrito anteriormente. El ADN del vector pCI se digirió primeramente con *BamHI* y los extremos colgantes 5' se rellenaron mediante incubación con la enzima de Klenow y dNTPs. Después de purificación con GeneCleanII (Bio 101, Vista, CA), el ADN plásmido tratado se digirió, a continuación, con *BglIII* y el fragmento de 1348 bp, constituido, en orden, por el promotor/potenciador prematuro inmediato del citomegalovirus humano (CMV), un intrón quimérico compuesto del sitio de corte y empalme 5' para el intrón de  $\beta$ -globina y el sitio de corte y empalme 3' procedente de un intrón de IgG, un sitio de clonación múltiple, y la secuencia poli(A) de la región tardía de SV40, se insertaron dentro del pBGSVG plásmido digerido con *EcoRI*, rellenado de extremos colgantes 5', y se digirió con *BglIII*. La purificación sobre gel del fragmento que contenía la caja de expresión pol II no fue necesaria, puesto que los clones se seleccionaron con medios que contenían kanamicina sobre los cuales pueden desarrollarse bacterias que contienen el vector pBGSVG (gen *kan<sup>r</sup>*), pero no el vector pCI (gen *amp<sup>r</sup>*). Este plásmido se le designó como pBGSVG-pol II.

A continuación, el gen lac Z o el gen de la glicoproteína B (gB) procedente de HSV-1 se insertó dentro del poliligador de pBGSVG-pol II. La fuente del gen lac Z fue el Vector de Control pSV- $\beta$ -galactosidasa (Promega, Madison, WI), a partir del cual se le aisló en forma de un fragmento *HindIII-BamHI* de 3737 bp, ligado dentro del pKS+ plásmido (Stratagene, La Jolla, CA) y, a continuación, se volvió a aislar mediante digestión con *XhoI* y *NotI*, y se ligó dentro del pBGSVG-pol II plásmido que se digirió con *XhoI* y *NotI*. Este plásmido se le designó como pBGSVG-pol II/ $\beta$ -gal.

## ES 2 300 261 T3

El gen de la glicoproteína B (gB) de la cepa KOS de HSV-1 se obtuvo del Dr. Martin Muggeridge (LSU Medical Center, Shreveport, LA) y se subclonó dentro del pBGSVG-pol II plásmido entre los sitios *Xho*I y *Xba*I dentro de la secuencia de clonación múltiple. Este plásmido se le designó como pBGSVG-pol II/gB-1.

5 A continuación, la caja de expresión basada en pol III se insertó dentro de los pBGSVG, pBGSVG-pol II/ $\beta$ -gal, o pBGSVG-pol II/gb-1 plásmidos, en el sitio único *Bgl*II. El ensamblado de los componentes deseados en la caja de expresión basada en pol III se llevó a cabo mediante PCR para yuxtaponer las secuencias ordenadas siguientes:

10 Relleno de Ad2 (nts. 1051-10584): (SEC. ID. NO.)

5'CCATGGTTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGCAGTCGTTGACGCTC  
TGGA-3'

15 Promotor de ARN de Ad2 VA1 [(-70/+30) (nts. 10585-10682)]: (SEC. ID. NO.)

20 5'CCGTGCAAAAGGAGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGGA  
TAAATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTCGAACCCCGGA-3'

25 Rinovirus 1A 3C proteasa (nts. 447-457): (SEC. ID. NO.)

30 5'CCTAAAACCAAAGTACCTGAAAGAAGAGTAGTTGCTCAAGGTCCAGAAG  
AAGAATTTGGAAGGTCAATTCTCAAAAACAATACTTGTGTGATTACTACAG  
G-3'

35 Tallo: (SEC. ID. NO.)

5'-CCCCCCCCCCC-3'

40 Rinovirus 1A 3C proteasa (nts. 447-457) ANTISENTIDO: (SEC. ID. NO.)

45 5'CCTGTAGTAATCACACAAGTATTGTTTTGAGAATTGACCTTCCAAATTCT  
TCTTCTGGACCTTGAGCAACTACTCTTCTTTCAGGTACTTTGGTTTTAGG-3'

50 Secuencia de terminación de ARN polimerasa III: (SEC. ID. NO.)

5'-GCGCTTTTTGCGC-3'

55 Adicionalmente, se entremezclaron los sitios de restricción siguientes dentro de la caja de expresión pol III con el fin de facilitar el intercambio de los elementos ordenados presentes dentro del constructo:

<u>Enzima</u>	<u>Secuencia de reconocimiento</u>
<i>Bgl</i> II	A'GATCT
<i>Bsp</i> EI	T'CCGGA
<i>Eco</i> RI	G'AATTC
<i>Xba</i> I	T'CTAGA

## ES 2 300 261 T3

La configuración de los elementos de la secuencia ordenados presentes en la caja de expresión pol III es 5'-BgIII-Relleno de Ad2-promotor de Ad2 VA1-XbaI-tallo con sentido de Rinovirus-hélice-tallo antisentido de Rinovirus-EcoRI- terminación pol III-BspEI-BgIII-3'.

5 La yuxtaposición de los elementos de la secuencia mostrada anteriormente para construir la caja de expresión basada en pol III se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se usaron los oligonucleótidos complementarios parcialmente mostrados más adelante, cada uno a una concentración de 1  $\mu$ M en una amplificación mediante PCR corta (10 ciclos):

10

Ad2Va 1F: (SEC. ID. NO.)

5'AGATCTCCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGCAGTCGTTG  
15 ACGCTCTGGACCGTGCAAAAGGAGAGCC-3'

20

Ad2Va 1R: (SEC. ID. NO.)

5'CCCTTGCGAATTTATCCACCAGACCACGGAAGAGTGCCCGCTTACAGGCT  
25 CTCCTTTT-3'

25

Ad2Va 2F: (SEC. ID. NO.)

5'AATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTCTGAACCCCGGATCTA  
30 GACCTAAAACCAAAGTACCTGAAAGAAGA-3'

30

35

Ad2Va 2R: (SEC. ID. NO.)

5'TGAGAATTGACCTTCCAAATTCTTCTTCTGGACCTTGAGCAACTACTCTTC  
40 TTTCAGG-3'

40

Ad2Va 3F: (SEC. ID. NO.)

5'GGTCAAATTCTCAAAAACAATACTTGTGTGATTACTACAGGCCCCCCCCCC  
45 CCTGTAGTAATCACACAAGTATTGTTTTT-3'

45

50

Ad2Va 3R: (SEC. ID. NO.)

5'AGTAGTTGCTCAAGGTCCAGAAGAAGAATTTGGAAGGTCAATTCTCAAAA  
55 ACAATACT-3'

55

60

Ad2Va 4F: (SEC. ID. NO.)

5'TGAGCAACTACTCTTCTTTCAGGTACTTTGGTTTTAGGGAATTCGCGCTTT  
65 TTGCGCTCCGGAAGATCT-3'

65

## ES 2 300 261 T3

### Ad2Va 4R: (SEC. ID. NO.)

5'-AGATCTTCCGGAGCGCAAAAAG-3'

5

La amplificación mediante PCR de los oligonucleótidos que comprenden la caja de expresión basada en pol III mostrada anteriormente, se llevó a cabo un una única reacción, usando la ADN polimerasa Vent<sub>R</sub> (New England Biolabs, Beverly, MA), y las condiciones de reacción sugeridas por el suministrador, conteniendo además MgSO<sub>4</sub> 2 mM, DMSO al 5%, y esféulas Hot Start Wax (Perkin-Elmer), con el protocolo de amplificación mediante PCR, tal como se muestra a continuación.

10

	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min.)</u>	<u>No. de ciclos</u>
15	95	2	1
	95	0,5	
	55	0,5	10
20	72	0,5	

Los productos de PCR se purificaron (kit de purificación de PCR QIAquick, QIAGEN, Chatsworth, California) y los productos de reacción purificados se usaron en una segunda amplificación mediante PCR, con el par cebador mostrado a continuación:

25

### PCR de Ad2 1F: (SEC. ID. NO.)

5'-CCCTTCCCAGATCTCCATGGTCTGGGACG-3'

30

### PCR de Ad2 1R: (SEC. ID. NO.)

5'-TTTCCTTTAGATCTTCCGGAGCGCAAAAAG-3'

35

La amplificación mediante PCR de la caja de expresión a base de pol III procedente de la primera amplificación PCR mostrada anteriormente, se llevó a cabo con la ADN polimerasa Vent<sub>R</sub> (New England Biolabs, Beverly, MA), y las condiciones de reacción sugeridas por el suministrador, conteniendo además MgSO<sub>4</sub> 2 mM, DMSO al 5%, y esféulas Hot Start Wax (Perkin-Elmer), con el protocolo de amplificación mediante PCR mostrado a continuación.

40

	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min.)</u>	<u>No. de ciclos</u>
45	95	2	1
	95	0,5	
50	55	0,5	20
	72	0,5	
	72		1

55

Los productos de esta segunda reacción mediante PCR se purificaron con un kit QIAquick y, a continuación, se insertaron directamente dentro del vector de ADN plásmido pCR Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido se le designó como pCR-pol III.

60

Como alternativa, los productos purificados de esta segunda reacción mediante PCR se digirieron con *Bg*III, se purificaron, y se ligaron dentro de los pBGSVG, pBGSVG-pol III/ $\beta$ -gal, o pBGSVG-pol II/gb-1 plásmidos, preparados mediante digestión con *Bg*III, tratamiento con fosfatasa alcalina intestinal de vacuno, y purificación. Con todos los constructos plásmidos, se aislaron clones que contenían la caja de expresión pol III en ambas orientaciones (F o R, véase más adelante). Estos plásmidos se designaron como:

65

pBGSVG-pol III(F)

pBGSVG-pol III(R)

pBGSVG.pol II/ $\beta$ -gal-pol III(F)

pBGSVG.pol II/ $\beta$ -gal-pol III(R)

5 pBGSVG.pol II/gB-1-pol III(F)

pBGSVG.pol II/gB-1-pol III(R)

10 Para demostrar la funcionalidad de la caja de expresión pol III, se transfectaron células cultivadas con pBGSVG.pol II/ $\beta$ -gal-pol III(F), pBGSVG.pol II/ $\beta$ -gal-pol III(R), o pBGSVG.pol II/gal plásmido, y la expresión de la especie de ARN de doble hebra predicha se determinó mediante análisis de mancha de puntos de ARN del ARN total purificado a las 48 horas de transfección, y tratado subsiguientemente con DNasa. La secuencia predicha de ARN de doble hebra (es decir, complementaria), debido a su estructura, debería ser también resistente al tratamiento con RNasa. Se transfectaron células de riñón-21 de hamster infantil (BHK-21) con 1,0  $\mu$ g de ADN plásmidos acoplados con 15 4,0  $\mu$ l de un lípido comercialmente disponible (Lipofectamine, GIBCO-BRL). Se agregó medio esencial mínimo de Eagle suplementado con suero bovino fetal al 10% a las células a las 4 horas post-transfección (hpt), salvo que se indique lo contrario. Las células transfectadas se incubaron a 37°C. A las 48 horas post-transfección, se determinó la expresión del gen informador  $\beta$ -galactosidasa mediante tinte *in situ* directo de células fijadas con X-gal tal como se ha descrito anteriormente (MacGregor, *Cell Mol. Genet.*, vol. 13, págs. 253-265, (1987)). La eficacia de la transfección con cada uno de los tres plásmidos ensayados fue equivalente y aproximadamente del 10%. Como alternativa en otras muestras, el ARN total se aisló usando un reactivo comercialmente disponible (Tel-Test, TX), de acuerdo con 20 las instrucciones del suministrador. Todas las muestras se trataron con DNasa. La mitad de las muestras se trataron también con RNasa, para reducir la viscosidad de la muestra y para demostrar la presencia de una especie de ARN de doble hebra, resistente a digestión con nucleasa. Las muestras purificadas se cargaron sobre Zeta Probe (Bio-Rad, Richmond, CA) tal como sigue, y se hibridaron con sonda Ad2VA 3R marcada con <sup>32</sup>P. Se encontró que el ARNds estaba expresado en células transfectadas con los pBGSVG.pol II/ $\beta$ -gal-pol III(F) y pBGSVG.pol II/ $\beta$ -gal-pol III (R) plásmidos, pero no con pBGSVG.pol II/gal plásmido, lo que demuestra que, tal como se esperaba, las cajas de expresión basadas en pol III sintetizan una especie de ARN de doble hebra que es resistente a RNasa.

30 Además de la configuración del ARNds descrito anteriormente, son fácilmente realizables para un experto en la técnica un cierto número de variaciones o modificaciones de la caja de ARNds. Estas incluyen secuencias alternativas que forman un ARNds de horquilla similar, pero con la misma u otras secuencias que forman un región más larga o mas corta de ARNds, dando como resultado la sustitución o sustituciones de nucleótidos en menos del 100% de emparejamiento de bases dentro de la estructura de ARNds, la inserción de una secuencia de ribozima dentro de 35 la región de hélice de base no pareada para escisión en dos ARNds complementarios, separados, que forman ARNds (Figura 2), secuencias que forman ARNds de "tipo viroide" auto-complementario, circular (Figura 3), y el uso de dos cajas de expresión separadas para la transcripción de ARNds complementarios que forman ARNds (Figura 2).

#### Ejemplo 2

40 *Estimulación inmune mediante la promoción de la apoptosis*

La presente invención proporciona también composiciones y procedimientos para la estimulación de una respuesta inmune específica para un agente patógeno mediante la expresión, además de a un antígeno a partir del agente patógeno, de una o más secuencias de ácido nucleico que promueven la apoptosis. La secuencia de ácido nucleico expresada que promueve la apoptosis puede ser de codificación (por ejemplo, contiene el código de un polipéptido) o de no codificación (por ejemplo, ribozima, ARN antisentido); y la promoción de la apoptosis puede ser directa (por ejemplo, vía una señal inductiva) o indirecta (por ejemplo, supresión de un gen anti-apoptótico). Además, las cajas de expresión que contienen las secuencias de ácido nucleico que promueven la apoptosis pueden ser parte del mismo vehículo de suministro del gen que expresa el antígeno (Figura 5), como cajas distintas o una única caja (es decir, usando un IRES), o puede estar contenidas dentro de un vehículo que suministra un gen diferente a partir del cual se expresa el antígeno. En aquellas circunstancias en las que la secuencia pro-apoptótica se expresa a partir de un vehículo de suministro de gen diferente que el vehículo que suministra el gen que expresa el antígeno, la administración a un animal de sangre caliente puede ser simultánea, o de manera separada en cualquier orden deseado.

55 Pueden seleccionarse numerosos elementos de la cascada reguladora apoptótica para uso de acuerdo con las directrices de la presente invención, incluyendo por ejemplo, la expresión de productos de genes pro-apoptóticos tales como Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim<sub>L</sub>, Bad, Bid, ligando Fas y EGL-1, o la supresión de productos de genes anti-apoptóticos tales como Bcl-2, Bcl-xL y CED-9. Además, debería tenerse en consideración por los expertos en la técnica que aunque se ilustran construcciones de vectores con únicamente un antígeno, este antígeno se proporciona como un ejemplo y se basa en las directrices aquí proporcionadas, pudiéndose elegir antígenos alternativos a partir de una diversidad de agentes patógenos, incluyendo por ejemplo, virus, bacterias, hongos, parásitos, y células de cáncer, siempre y cuando existan disponibles datos de secuencias suficientes como para facilitar la clonación de los antígenos.

#### 65 A. Co-expresión de un producto de gen pro-apoptótico

Para demostrar los efectos inmunoestimulantes de la expresión tanto de una secuencia pro-apoptótica como de un antígeno de vacuna procedente de un único vector de suministro de gen, se eligió, por ejemplo, la glicoproteína

## ES 2 300 261 T3

B del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) como el antígeno y como el producto de gen pro-apoptótico se eligió, por ejemplo, BAX $\alpha$  murino. La glicoproteína B proporciona una medida bien caracterizada tanto de inducción inmune humoral y celular, como de protección frente a la exposición a HSV virulenta en un modelo de ratón (Hariharan y otros, *J. Virol.*, vol. 72, págs. 950-958, (1998)). El BAX $\alpha$  murino se prefirió sobre el BAX $\alpha$  humano para estudios de vacunas en el modelo ratón; sin embargo, se proporcionan igualmente detalles para constructos similares que contienen BAX $\alpha$  humano. La construcción de un vector de ADN plásmido que expresa tanto glicoproteína B de HSV-1 como BAX $\alpha$  se llevó a cabo aislando primeramente un fragmento que comprende los elementos ordenados de promotor temprano inmediato de CMV, glicoproteína B de HSV-1, señal de poliadenilación de SV40 procedente de pCl-gB plásmido (Hariharan y otros, véase cita anterior). El pCl-gB plásmido se digirió con *Bgl*II y *Bam*HI, el ADN se terminó con extremos romos usando enzima de Klenow y dNTPs, el fragmento que contiene la glicoproteína B se purificó a partir de un gel de agarosa usando GeneCleanII (BIO101, Vista, CA) y, a continuación, se ligó dentro de un vector plásmido anteriormente descrito pBGSVG (patente WO 97/38087) se digirió con *Pac*I e igualmente se terminó con extremos romos, usando ADN polimerasa T4 y dNTPs. El constructo resultante se le designó como pBGSV-gB.

La inserción de una caja de expresión para BAX $\alpha$  dentro de pBGSV-gB se llevó a cabo aislando primeramente a partir de pCi plásmido (Promega, Madison, WI), un fragmento que comprende los elementos ordenados de promotor temprano inmediato de CMV, sitio de clonación múltiple, señal de poliadenilación de SV40. El fragmento se aisló mediante digestión con *Bgl*III y *Bam*HI, se terminó con extremos romos con Klenow y dNTPs, y purificación a partir de un gel de agarosa usando GeneCleanII. A continuación, el fragmento se ligó dentro de un pBGSVG plásmido que había sido digerido con *Pme*I, se trató con fosfatasa alcalina, y se purificó a partir de un gel de agarosa, produciendo el constructo pBGSV-gB-cass2. El BAX $\alpha$  se obtuvo por amplificación mediante PCR usando dos cebadores oligonucleótidos:

### BAX $\alpha$ fwd

5'ATATATGAATTTCGGTGATGGACGGGTCCGGGGAGCAG

### BAX $\alpha$ rev

5'TATATAGAATTCTCAGCCCATCTTCTTCCAGATGGTG

que contienen sitios de restricción *Eco*RI flanqueantes, polimerasa PFU Turbo (Stratagene, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de fabricante, ADN molde procedente de bibliotecas de ADNc de célula B de ratón o humana CLONTECH, Palo Alto, CA), o procedente de plásmidos comercialmente disponibles (INVIVOGEN, San Diego, CA). Como alternativa, puede usarse ARN purificado polyA procedente de células linfoides de ratón y humanas (por ejemplo, líneas de células RL7 y FL5.12; Oltvai y otros, *Cell*, vol. 74, págs. 609-619, (1993)) como molde para reacciones mediante PCR acopladas a transcriptasa inversa. Después de la amplificación, el producto de PCR se purificó con un kit QIAquick (QUIAGEN, Chatsworth, CA), se digirió con *Eco*RI, se volvió a purificar con QIAquick, y se ligó con pBGSV-gB-cass2 plásmido, el cual había sido digerido igualmente con *Eco*RI y se trató con fosfatasa alcalina. Se obtuvieron constructos con el inserto BAX $\alpha$  tanto en la orientación correcta como en la opuesta (control negativo), designándose a estos plásmidos como pBGSV-gB-BAX y pBGSV-gB-BAXrev.

A partir de estas exposiciones, un experto en la técnica construirá fácilmente construcciones similares que expresen otros genes o antígenos pro-apoptóticos.

### *B. Co-expresión de ARN antisentido específico para genes anti-apoptóticos*

En constructos alternativos, se expresó a partir de una caja, tal como ARN polimerasa III (pol III), una secuencia de ribozima o antisentido, la cual se hibrida específicamente al ARNm de un gen anti-apoptótico. Tal como se ha descrito anteriormente, esta caja se construyó preferiblemente como parte del mismo vector de suministro del gen (por ejemplo, ADN plásmido) que expresa el antígeno deseado. Sin embargo, este puede estar contenido también dentro de un vector separado que se administra al mismo vacunado como el vector de suministro del gen que expresa el antígeno.

Por ejemplo, se construyó una caja en la que un promotor ARN polimerasa III está ligado de manera operable con una secuencia, la cual, cuando se transcribe, da lugar a un ARN antisentido que se une específicamente a la región 5' del ARNm del gen Bcl-2 anti-apoptótico (Tsumimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 83, págs. 5214-5218, (1986)). Específicamente, una caja que comprende los elementos ordenados siguientes: sitio de restricción *Eco*RI para clonación, promotor de ARN de Adenovirus 2 VA1 (nucleótidos -70/+30), nucleótidos 4-44 de la secuencia que codifica el gen Bcl-2 humano, secuencia de terminación de transcripción de consenso de ARN polimerasa III, y sitio de restricción *Eco*RI para clonación. Adicionalmente o como alternativa, las secuencias Bcl-2 pueden substituirse igualmente por nucleótidos 4-44. Con el fin de proporcionar un mecanismo para demostrar el efecto inmoestimulante de esta vía, los elementos se insertaron dentro del constructo pBGSV-gB anteriormente descrito, el cual codifica la glicoproteína B de HSV.



## ES 2 300 261 T3

El ensamblado de los componentes deseados en la caja de expresión basada en pol III, se llevó a cabo mediante PCR para yuxtaponer las secuencias ordenadas siguientes:

5 Relleno de Ad2 (nts. 1051-10584):

5'CCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGCAGTCGTTGACGCTC  
TGGA-3'

10 Promotor de ARN de Ad2 VA1 [(-70/+30) (nts. 10585-10682)]:

15 5'CCGTGCAAAAGGAGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGGA  
TAAATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTCGAACCCCGGA-3'

20 Secuencia de codificación de Bcl-2 humana que comprende los nucleótidos 4-44:

5'GCGCACGCTGGGAGAACGGGGTACGACAACCGGGAGATAGT

25 Secuencia de terminación de ARN polimerasa III:

5'-GCGCTTTTTGCGC-3'

30 La yuxtaposición de los elementos de la secuencia mostrada anteriormente para construir la caja de expresión basada en pol III se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa usa los oligonucleótidos parcialmente complementarios mostrados a continuación, cada uno de ellos a una concentración de 1  $\mu$ M en una amplificación mediante PCR corta (10 ciclos):

35 Ad2V Abcl 1F:

40 5'GAATTCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGCAGTCGTTGA  
CGCTCTGGACCGTGCAAAAGGAGAGCC-3'

45 Ad2V Abcl 1R:

5'CCCTTGCGAATTTATCCACCAGACCACGGAAGAGTGCCCGCTTACAGGCT  
CTCCTTTT-3'

50 Ad2V Abcl 2F:

55 5'AATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTCGAACCCCGGAACT  
ATCTCCCGGTTGTCGTACCCCGTTC-3'

60 Ad2V Abcl 2R:

5'GAATTCGCGCAAAAAGCGCGCGCACGCTGGGAGAACGGGGTACGA-3'

65 La amplificación mediante PCR de los oligonucleótidos que comprenden la caja de expresión basada en poli III mostrada anteriormente, se llevó a cabo en una única reacción, usando Vent polimerasa y las condiciones de reacción sugeridas por el suministrador, conteniendo además  $MgSO_4$  2 mM, DMSO al 5%, y esferulas Hot Start Wax (Perkin-Elmer), con el protocolo de amplificación mediante PCR tal como se muestra a continuación.

## ES 2 300 261 T3

	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min.)</u>	<u>No. de ciclos</u>
	95	2	1
5	95	0,5	
	55	0,5	10
	72	0,5	

10 El producto de PCR se purificó usando el kit de PCR QIAquick, y el producto purificado se usó en una segunda amplificación mediante PCR, con el par cebador mostrado a continuación:

### PCR de AdVA 1F:

15 5'-ATATATAGAATTCCATGGTCTGGGACGC

### PCR de AdVA 1R:

20 5'-ATATATGAATTCGCGCAAAAAGCGC

25 La segunda amplificación mediante PCR de la caja de expresión basada en poli III, se llevó a cabo en con la Vent polimerasa y condiciones de reacción similares, con el protocolo de amplificación mediante PCR tal como se muestra a continuación.

	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min.)</u>	<u>No. de ciclos</u>
30	95	2	1
	95	0,5	
35	55	0,5	20
	72	0,5	
	72		1

40 El producto de esta segunda reacción mediante PCR se purificó con el kit QIAquick, se digirió con *EcoRI*, se volvió a purificar, y, a continuación, se insertó dentro del vector pBGSV-gB que también había sido digerido con *EcoRI* y se trató con fosfatasa alcalina. Este plásmido se le designó como pBGSV-gB $\alpha$ Bcl.

45 Para un conjunto separado de amplificaciones mediante PCR, se substituyó por un par adicional de cebadores oligonucleótidos (mostrados a continuación) los Ad2V abcl 2F y Ad2V bcl 2R, con el fin de generar una caja de control negativo que permita la construcción de la secuencia Bcl-2 en la orientación con sentido.

### Ad2V Abcl 3F

50 5' AATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTCGAACCCCGGAGCG  
CACGCTGGGAGAACGGGGTACGACA-3'

### Ad2V Abcl 3R

55 5' GAATTCGCGCAAAAAGCGCACTATCTCCCGGTTGTCGTACCCCGT-3'

60 Estos cebadores se usaron tal como se ha descrito anteriormente para generar un segundo fragmento con extremos *EcoRI*, y que cuando se insertaron dentro de pBGSV-gB, dieron como resultado un constructo plásmido designado como pBGSV-gBBcl.

65 A partir de estas exposiciones, un experto en la técnica construirá fácilmente construcciones similares que usan secuencias de ribozima (véase más adelante) específicas para Bcl-2, así como secuencias de ribozima o antisentido específicas para otros genes anti-apoptóticos.

C. Determinación de efectos inmunoestimulantes para secuencias pro-apoptóticas

Para demostrar los efectos inmunoestimulantes de estas modificaciones de vectores, se inmunizaron intramuscularmente múltiples ratones BALB/c con pBGSV-gB-BAX, pBGSV-BAXrev, pBGSV-gB $\alpha$ Bcl y pBGSV-gBBcl plásmidos en solución salina, a dosis que variaron desde 10 ug hasta 10 ng. Después de estas inmunizaciones, se determinó el nivel de anticuerpo específico de HSV-gB y de CTL inducido por cada constructo de acuerdo con Hariharan y otros (véase cita anterior). Además, fueron expuestos también animales representativos con HSV virulento para determinar el nivel de protección (Hariharan y otros, véase cita anterior). Unos niveles similares de respuesta inmune o de protección a dosis de ADN más bajas mediante los vectores modificados comparados con los vectores convencionales o de control es indicativo de estimulación inmune por los elementos de la presente invención.

Ejemplo 3

*Interrupción de la expresión IRF2 para potenciar la eficacia inmune*

Además de los ejemplos anteriores, la presente invención proporciona también composiciones y procedimientos de estimulación inmune que usan secuencias de ARN de ribozima o antisentido específicas transcritas *in vivo* que identifican uno o más ARNm que codifican componentes reguladores inmunes. Las secuencias ribozima o antisentido pueden co-expresarse con un antígeno deseado a partir de un agente patógeno, o expresarse solas y administrarse a un animal de sangre caliente con o sin el antígeno deseado o vector de suministro de gen que expresa el antígeno.

El IFN $\gamma$  juega un papel importante en la respuesta inmune mediante la inducción de actividad antivírica y bactericida, la estimulación de la presentación del antígeno a través de moléculas MHC de clase I y clase II, y mediante la inducción de la expresión de genes IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , así como una diversidad de genes cuyas funciones no han sido todavía determinadas. Un gen de respuesta primaria a IFN $\gamma$  es el factor 1 regulador del interferón (IRF1). El IRF1 es un factor de transcripción que está expresado al nivel de pocas copias de ARNm por célula antes de la inducción por IFN $\gamma$  (Fujita y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, págs. 9936-9940, (1989); Harada y otros, *Cell*, vol. 58, págs. 729-739, (1989)). La expresión constitutiva del IRF1 ratones transgénicos da como resultado una mayor resistencia a ARN de virus (Pine, *J. Virol.*, vol. 66, págs. 4470-4478, (1992)) y la sobre-expresión en células COS da como resultado la inducción de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  sin estimulación vírica (Fujita y otros, *Nature*, vol. 337, págs. 270-272, (1989)). El factor 2 regulador del interferón (IRF2) es un inhibidor de la transcripción que está expresado de manera constitutiva en muchas células y antagoniza la actividad de IEF1, mediante unión al mismo elemento promotor en los IFNs y genes inducibles de IFN. (Harada y otros, véase cita anterior). De acuerdo con ello, el IRF2 es un regulador negativo de la respuesta de IFN $\gamma$ .

Un mecanismo para interferir con la expresión de IRF2 en células que producen un antígeno de interés puede reforzar la respuesta inmune a dicho antígeno. En particular, un ARN antisentido o ribozima dirigido al ARNm de IRF2 se transcribe *in vivo* a partir de una caja de expresión contenida dentro de un vector de suministro de gen, para inhibir la expresión de IRF2 y prolongar los efectos de IFN $\gamma$  inducido por la expresión de un antígeno de interés. Preferiblemente, el ARN antisentido o ribozima se expresa a partir del mismo vector de suministro de gen que codifica el antígeno(s) de interés, y se expresa usando una caja de ARN polimerasa III. El ARN antisentido o ribozima puede dirigirse (complementariamente) al ARNm del primer exón del gen IRF2. Puesto que los 125 aminoácidos N-terminales de IRF2, que contienen el código de la actividad reguladora de transcripción, muestran un alto grado de homología con la misma región en IRF1, los exones II, III y IV son menos adecuados para identificación.

Por ejemplo, se construyó primeramente una caja de expresión de ARN polimerasa III para expresar un ribozima de cabeza de martillo específico para IRF2. Pueden elegirse una diversidad de sitios de escisión diana en el ARNm de IRF2 y en la Figura 6 se describen algunos, que se muestran un tipo negrita. Para fines de esta ilustración, el sitio diana elegido está encajonado y las secuencias "antisentido" complementarias usadas por el ribozima para reconocimiento de la diana están subrayadas.

Específicamente, la caja pol III/ribozima se construyó de manera que contuviera los elementos ordenados siguientes: sitio de restricción *PacI*, promotor de ARN de Adenovirus 2 VA1 (nucleótidos -70/+30), ribozima específico de IRF2, secuencia de terminación de transcripción de consenso de ARN pol III, sitio de restricción *PacI*. Estos elementos se sintetizaron usando PCR de solapamiento y se clonaron dentro de un vector de ADN plásmido resistente a la kanamicina obtenido de pUC, pBGSVG (patente WO 97/38087), con una secuencia de poliligador <*PmeI*-*BglIII*-*XhoI*-*NotI*-*EcoRI*-*PmeI*> y sitio *PacI* único sobre el lado opuesto de la estructura principal del vector.

El ensamblado de los componentes deseados en la caja de expresión basada en pol III, se llevó a cabo mediante PCR para yuxtaponer las secuencias ordenadas siguientes:

Relleno de Ad2 (nts. 1051-10584):

5'CCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGCAGTCGTTGACGCTC  
TGGA-3'

## ES 2 300 261 T3

Promotor de ARN de Ad2 VA1 [(-70/+30) (nts. 10585-10682)]:

5 5'CCGTGCAAAAGGAGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGGA  
TAAATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTTCGAACCCCGGA-3'

10 Ribozima específico de IRF2

5'CTCAGTGTGCTTTTTTCACGCCTGATGAGGCCGTGAGGCCGAAACCAAT  
15 ACAATTCCGCAAGG-3'

Secuencia de terminación de ARN polimerasa III:

20 5'-GCGCTTTTTGCGC-3'

25 La yuxtaposición de los elementos de la secuencia mostrada anteriormente para construir la caja de expresión basada en pol III se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa usa los oligonucleótidos parcialmente complementarios mostrados a continuación, cada uno de ellos a una concentración de 1  $\mu$ M en una amplificación mediante PCR corta (10 ciclos):

VAIRF2-1F:

30 5'CACACACTTAATTAACCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCG  
CAGTCG-3'

35 VAIRF2-1R:

40 5'CCGCTTACAGGCTCTCCTTTTGCACGGTCCAGAGCGTCAACGACTGCGCA  
CGCCT-3'

VAIRF2-2F:

45 5'AGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAAG  
GGTAT -3'

50 VAIRF2-2R:

55 5'CACACTGAGTCCGGGGTTCGAACCCCGGTCGTCCGCCATGATACCCTTGC  
GAATT-3'

VAIRF2-3F:

60 5'CCCGGACTCAGTGTGCTTTTTTCACGCCTGATGAGGCCGTGAGGCCGAA  
ACCAAT-3'

65

VAIRF2-3R:

5'GTGTGTTTAATTAAGCGCAAAAAGCGCCCTTGCGGAATTGTATTGGTTTC  
GGCCTC-3'

La amplificación mediante PCR de los oligonucleótidos que comprenden la caja de expresión basada en pol III mostrada anteriormente, se llevó a cabo en una única reacción, usando Vent polimerasa y las condiciones de reacción sugeridas por el suministrador, conteniendo además MgSO<sub>4</sub> 2 mM, DMSO al 5%, y esférulas Hot Start Wax, con el protocolo de amplificación mediante PCR tal como se muestra a continuación.

<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min.)</u>	<u>No. de ciclos</u>
95	2	1
95	0,5	
55	0,5	10
72	0,5	

El producto de PCR se purificó usando el kit de PCR QIAquick, y, a continuación, se usó en una segunda amplificación mediante PCR, con los cebadores VAIRF2-1F y VAIRF2-3R. La segunda amplificación mediante PCR de la caja de expresión basada en pol III, se llevó a cabo con Vent polimerasa y condiciones de reacción similares, con el protocolo de amplificación mediante PCR tal como se muestra a continuación.

<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min.)</u>	<u>No. de ciclos</u>
95	2	1
95	0,5	
55	0,5	20
72	0,5	
72		1

El producto de esta segunda reacción mediante PCR se purificó con el kit QIAquick, se digirió con *PacI*, se volvió a purificar y, a continuación, se insertó dentro del vector pBGSVG-pol II (Ejemplo 1) que había sido igualmente digerido con *PacI* y se trató con fosfatasa alcalina. Este vector de suministro de gen basado en plásmido se le designó como pBGSrIRF2.

Para demostrar la interrupción de la expresión de IRF2 mediante ARNs antisentido o ribozima dirigidos, se usó un sistema de gen informador similar al de Harada y otros (véase cita anterior). En este sistema, se insertó un sitio de unión IRF1/IRF2 dentro de un constructo informador interpuesto entre un elemento potenciador de SV40 y la expresión que impulsa el promotor más abajo de un gen informador. La transfección de este plásmido informado dentro de células que expresan IRF2 da como resultado la supresión de la expresión del informador. La co-transfección de las células que expresan IRF2 con el plásmido informador y un vector de suministro de gen de la presente invención (por ejemplo, el pBGSrIRF2 anterior) permiten una medición directa de la inhibición de la expresión de IRF2.

## Ejemplo 4

*Interrupción de la expresión de ciclooxigenasa-2 para inhibir el desarrollo de células de cáncer y facilitar la citotoxicidad mediada por huésped contra tumores*

La prostaglandina E2 (PGE2) es una de las diversas moléculas inmunosupresoras secretadas por tumores y su secreción se relaciona con la progresión del tumor. La presencia de altos niveles de moléculas inmunosupresoras es al menos parcialmente achacable a la capacidad de un tumor para escapar a los mecanismos de vigilancia inmune del huésped. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) está implicada directamente en la síntesis de PGE2. Se han encontrado diversos tumores para expresar altos niveles de COX2 (Liu y otros, *Cancer Res.*, vol. 56, págs. 5125-5127, (1996); Ristimaki y otros, *Cancer Res.*, vol. 57, págs. 1276-1280, (1997)) y su expresión está relacionada con los potenciales metastáticos (Tsujii y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, págs. 3336-3340, (1997)). La presente invención proporciona vectores de suministro de genes y procedimientos para la interrupción identificada de la expresión de COX2 como un mecanismo para facilitar la terapia anti-tumor. Puesto que ha sido establecida la secuencia del

## ES 2 300 261 T3

ADNc de COX2 (Hla y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, págs. 7384-7388, (1992); O'Banion y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, págs. 4888-4892, (1992)), pueden diseñarse ARNs dirigidos contra el ARNm de COX2 para inserción dentro de la caja de expresión deseada, preferiblemente una caja de ARN polimerasa III. Igualmente, pueden elegirse otros productos de genes de la vía de la biosíntesis de PEG2 para identificación de acuerdo con la presente invención. Además, los vectores de suministro de genes anteriormente descritos pueden igualmente codificar una o más citocinas o antígenos de tumores.

Por ejemplo, puede construirse en primer lugar una caja de expresión de ARN polimerasa III para expresar un ribozima de horquilla específico para COX2. Pueden elegirse una diversidad de sitios de escisión diana de ARNm de COX2 para ribozimas de cabeza de martillo y horquilla, los cuales se representan en la Figura 6, mostrándose en tipo negrita. Para fines de esta ilustración, el sitio diana elegido está encajonado y las secuencias "antisentido" complementarias usadas por el ribozima para reconocimiento de la diana están subrayadas.

Específicamente, la caja pol III/ribozima puede construirse para contener los elementos ordenados siguientes: sitio de restricción *PacI*, promotor de ARN de Adenovirus 2 VA1 (nucleótidos -70/+30), ribozima específico de COX2, secuencia de terminación de transcripción de consenso de ARN pol III, sitio de restricción *PacI*. Estos elementos se sintetizaron usando PCR de solapamiento y se clonaron dentro de pBGSVG tal como se ha descrito en el ejemplo anterior. El ensamblado de los componentes deseados en la caja de expresión basada en pol III, se llevó a cabo mediante PCR para yuxtaponer las secuencias ordenadas siguientes:

### Relleno de Ad2 (nts. 1051-10584):

**5'CCATGGTTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGCAGTCGTTGACGCTC  
TGGA-3'**

### Promotor de ARN de Ad2 VA1 [(-70/+30) (nts. 10585-10682)]:

**5'CCGTGCAAAAGGAGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGA  
TAAATTCGCAAGGGTATCATGGCGGACGACCGGGGTTGGAACCCCGGA-3'**

### Ribozima específico de COX2

**5'GCAAGGATTTGCTGTATGGCTGAGCGCCAGAGAAGCGCACCAGAGAAAC  
ACACGTTGTGGTATATTACCTGGTA-3'**

### Secuencia de terminación de ARN polimerasa III:

**5'-GCGCTTTTTGCGC-3'**

La yuxtaposición de los elementos de la secuencia mostrada anteriormente para construir la caja de expresión basada en pol III se llevó a cabo en dos etapas, tal como se ha descrito en el ejemplo anterior, usando los cebadores oligonucleótidos siguientes

### VACOX2-1F:

**5'CACACATTAATTAACCATGGTTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGC  
AGTCGTT**

VACOX2-1R:

5 5'GTGCCCGCTTACAGGCTCTCCTTTTGCTCGGTCCAGAGCGTCAACGACTGC  
GCACGC

VACOX2-2F:

10 5'CCTGTAAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAAATTCGCAAGGGTA  
15 TCATGGC

VACOX2-2R:

20 5'ATACAGCAAATCCTTGCTCCGGGGTTCGAACCCCGGTCGTCCGCCATGAT  
ACCCCTTG

VACOX2-3F:

25 5'AAGGATTTGCTGTATGGCTGAGCGCCAGAGAAGCGCACCCAGAGAAACAC  
30 ACGTTGTG

VACOX2-3R:

35 5'TGTGTGTTAATTAAGCGCAAAAAGCGCTACCAGGTAATATAACCACAACGT  
40 GTGTTTC

45 El producto de PCR procedente de la primera reacción se purificó usando un kit de PCR QIAquick, y, a continuación, se usó en una segunda amplificación mediante PCR con los cebadores VACOX2-1F y VACOX2-3R. El producto de esta segunda reacción mediante PCR se purificó con el kit QIAquick, se digirió con *PacI*, se volvió a purificar y, a continuación, se insertó dentro del vector pBGSVG-polIII el cual había sido también digerido con *PacI* y se trató con fosfatasa alcalina. Este vector se le designó como pBGSrCOX2.

50 La capacidad de los vectores de suministro de genes de la presente invención para inhibir la expresión de COX2 puede controlarse en el cultivo de células mediante el ensayo de los cambios de secreción de PEG2 dentro del medio de cultivo después de la transfección de las células con pBGSrCOX2 o el plásmido de control pBGSVG. Puesto que se ha encontrado que el cáncer de colon produce altos niveles de PEG2, una línea de células obtenida a partir de este cáncer puede ser particularmente adecuada para el ensayo. El PEG2 puede detectarse con kits ELISA comercialmente disponibles.

## 55 Ejemplo 5

*Supresión de yin-yang-1 para potenciar la respuesta inmune*

60 En la regulación de la expresión de IFN $\gamma$  se encuentran implicados diversos factores de transcripción (Young, *J. Interferon & Cyt. Res.*, vol. 16, págs. 563-568, (1996)). El Yin-Yang 1 (YY1) es una proteína de unión de ADN omnipresente que regula la transcripción de diversos genes, incluyendo los oncogenes *c-myc* y *c-fos*. De acuerdo con el contexto, el YY1 puede actuar o bien como un regulador positivo o bien como un regulador negativo. El YY1 parece estar implicado en la represión de la transcripción de la expresión de IFN $\gamma$  mediante interacción con múltiples sitios en el promotor. Las mutaciones en los sitios de unión de YY1 dan como resultado un incremento de la actividad del promotor IFN $\gamma$  (Ye y otros, *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, págs. 4744-4753, (1996)). Parece ser que el YY1 reprime el  
65 promotor IFN $\gamma$  mediante unión a un sitio de solapamiento con el sitio de unión de AP1, el cual se requiere para la expresión de IFN $\gamma$  (Ye y otros, véase cita anterior).

La inmunización mediante vectores de suministro de genes, en particular ADN plásmido, parece ser eficaz en modelos animales, para la inducción de anticuerpos y respuestas de CTL asociados a CD8+ al antígeno expresado. Una característica deseable sería el incluir algunos mecanismos para la co-inducción de respuestas asociadas a CD4+ Th1. Puesto que el IFN $\gamma$  juega un papel principal en estas respuestas, se requiere la inducción de su expresión. Un ARN antisentido o ribozima puede expresarse *in vivo*, para identificar el ARNm de YY1 y sub-regular la expresión, facilitando, en consecuencia, la sobre-regulación de la expresión de IFN $\gamma$ . Un ARN antisentido o ribozima puede expresarse usando una caja de ARN polimerasa III, así como otros promotores de ARN polimerasa, generándose, de esta forma, una unidad que puede clonarse dentro del mismo vector de suministro de gene que el antígeno de interés. Igualmente, esta unidad puede usarse conjuntamente con otros mecanismos para reforzar la respuesta inmune, y en particular las aplicaciones de terapia de genes para las cuales la expresión de IFN $\gamma$  es un elemento deseable.

Por ejemplo, se construyó en primer lugar una caja de expresión de ARN polimerasa III para expresar un ribozima de cabeza de martillo específico para YY1. Pueden elegirse una diversidad de sitios de escisión diana de ARNm de YY1 para ribozimas de cabeza de martillo y horquilla, varias de los cuales se representan en la Figura 6, mostrándose en tipo negrita. Para fines de esta ilustración, el sitio diana elegido está encajonado y las secuencias "antisentido" complementarias usadas por el ribozima para reconocimiento de la diana están subrayadas. Específicamente, se construyó una caja de ribozima basada en pol III en pBGSVG, tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores. El ensamblado de los componentes se llevó a cabo nuevamente mediante PCR de solapamiento, con los cebadores oligonucleótidos siguientes:

VAYY1-1F:

**5'CACACACTTAATTAACCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCCGTGCG  
CAGTC-3'**

VAIYY1-1R:

**5'CGCTTACAGGCTCTCCTTTTGCACGGTCCAGAGCGTCAACGACTGCGCAC  
GCCTC-3'**

VAIYY1-2F:

**5'GAGAGCCTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAA  
GGGTA-3'**

VAIYY1-2R:

**5'CTACATCGTCCGGGGTTTCGAACCCCGGTCGTCCGCCATGATACCCTTGCG  
AATTT-3'**

VAIYY1-3F:

**5'CCCCGGACGATGTAGAGGGTGTGCCCCCTGATGAGGCCGTGAGGCCGA  
AAGGCCA-3'**

VAIRF2-3R:

**5'GTGTGTTTAAATTAAGCGCAAAAAGCGCGAGCCCTCAGCCATGGCCTTTTCG  
GCCTC**

El producto de PCR se purificó usando un kit de PCR QIAquick, y, a continuación, se usó en una segunda amplificación mediante PCR, con los cebadores VAIYY1-1F y VAIYY1-3R. A continuación, el producto de esta segunda reacción mediante PCR se purificó con el kit QIAquick, se digirió con *PacI*, se volvió a purificar y se insertó dentro de pBGSVG-polII el cual había sido también digerido con *PacI* y se trató con fosfatasa alcalina. Este vector de suministro de gen basado en plásmido se le designó como pBGSrYY1.



## Ejemplo 6

*Interrupción de la expresión de IL10 en células de tumor para respuesta anti-tumor*

5 Se ha mostrado que algunos tumores expresan y secretan una o más citocinas inmunosupresoras. La presencia de altos niveles de estas citocinas es achacable al menos parcialmente del escape de tumores de la inmunovigilancia del huésped. El IL 10 es capaz de bloquear la activación de diversas citocinas y diversas funciones accesorias de macrófagos, células T, y células NK (Fortis y otros, *Cancer Lett.*, vol. 104, págs. 1-5, (1996); Gotlieb y otros, *Cytokine*, vol. 4, págs. 385-90, (1992); Nagakomi y otros, *Int. J. Cancer*, vol. 63, págs. 366-71, (1995); Wojciechowska-Lacka y otros, *Neoplasma*, vol. 43, págs. 155-158, (1996)). La represión de la expresión de IL 10 se usó en tumores para facilitar el lavado inmune al huésped del tumor. Esta vía puede ser particularmente eficaz cuando se usa en combinación con la inmunización para antígenos de tumores definidos.

15 Específicamente, pueden construirse cajas de expresión para el suministro de ARNs de ribozima o antisentido que identifiquen específicamente y prevengan la expresión de IL 10. La secuencia de ADNc de IL 10 ha sido determinada (Vieira y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, págs. 1172-1176, (1991)), y dichos ARNs pueden ser suministrados y expresados *in vivo* usando cualquiera de entre un cierto número de vectores de suministro de genes diferentes, incluyendo ADN plásmido. Dichos vectores pueden usarse solos o en combinación con cajas similares identificadas a otras citocinas inmunosupresoras, y expresadas a partir del mismo vector de suministro de gen o a partir de un vector co-administrado separado. Además, los vectores pueden usarse conjuntamente con otros genes que codifican o bien citocinas o bien antígenos de tumores.

20 Por ejemplo, se construyó en primer lugar una caja de expresión de ARN polimerasa III para expresar un ribozima de cabeza de horquilla específico para IL-10. Pueden elegirse una diversidad de sitios de escisión diana de ARNm de IL-10 para ribozimas de cabeza de martillo y horquilla, varios de los cuales se representan en la Figura 6, mostrándose en tipo negrita. Para fines de esta ilustración, el sitio diana elegido está encajonado y las secuencias "antisentido" complementarias usadas por el ribozima para reconocimiento de la diana están subrayadas. Específicamente, se construyó una caja de ribozima basada en pol III en pBGSVG, tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores. El ensamblado de los componentes se llevó a cabo nuevamente mediante PCR de solapamiento, con los cebadores oligonucleótidos siguientes:

VAIL10-1F:

35 **5'CACACATTAATTAACCATGGTCGGGACGCTCTGGCCGGTGAGGCGTGCGC  
AGTCGTTG-3'**

VAIL10-1R:

40 **5'AGTGCCCGCTTACAGGCTCTCCTTTTGCACGGTCCAGAGCGTCAACGACT  
GCGCACG-3'**

VAIL10-2F:

50 **5'CTGTAAGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAAGGGTAT  
CATGGCG-3'**

VAIL10-2R:

60 **5'CCCACCTCCAGGCAACCTCCGGGGTTCGAACCCCGGTCGTCCGCCATGA  
TACCCTT-3'**

65

VAIL10-3F:

5 **5'TGCCTGGGAAGTGGGTGCAGCTGTTCTCAAGAAGGGTACCAGAGAAACA**  
**CACGTTGT-3'**

VAIL10-3R:

10  
 15 **5'TGTGTGTTAATTAAGCGCAAAAAGCGCTACCAGGTAATATACCACAACG**  
**TGTGTTTCT-3'**

20 El producto de PCR se purificó usando el kit de PCR QIAquick, y, a continuación, se usó en una segunda amplificación mediante PCR, con los cebadores VAIL10-1F y VAIL10-3R. A continuación, el producto de esta segunda reacción mediante PCR se purificó con el kit QIAquick, se digirió con *PacI*, se volvió a purificar y se insertó dentro de pBGSVG-polII el cual había sido también digerido con *PacI* y se trató con fosfatasa alcalina. Este vector de suministro de gen basado en plásmido se le designó como pBGSrIL10.

25 Para cada uno de los ejemplos anteriores, son fácilmente realizables cajas similares para un experto en la técnica, en las que la secuencia de ribozima está substituida por un ribozima alternativo o una secuencia antisentido con actividad no catalítica. En dichos casos, la elección de secuencias para identificación puede ser la misma que las descritas anteriormente, o puede ser específica para otras regiones de la molécula de ARNm.

## Ejemplo 7

*Co-expresión de antígeno con cajas ribozimal/antisentido*

35 Los antígenos obtenidos a partir de una diversidad de agentes patógenos (por ejemplo, tumor) pueden insertarse dentro de la caja de ARN polimerasa III contenida dentro de los plásmidos de expresión de ribozima o antisentido anteriores. Como alternativa, los antígenos pueden co-expresarse conjuntamente con los elementos ribozima o antisentido en otros vehículos de suministro de genes, tales como retrovirus (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.693.522, 5.691.177, 6.652.130, 5.591.624, y 5.830.458, referenciadas en su totalidad), adenovirus, o AAV.

40 Por ejemplo, se construyó un vector de ADN plásmido que expresa el antígeno Her2neu y un ribozima específico para COX-2. Específicamente, el antígeno Her2neu se clonó por ampliación mediante PCR, usando los cebadores oligonucleótidos siguientes que incorporan los sitios de restricciones *XbaI* y *NotI* flanqueantes.

Her2neuFwd

45 **5'ATATATATCTAGACACCATGGAGCTGGCGGCCTTGT**

Her2neuRev

50 **5'TATATAGCGGCCGCTCACACTGGCACGTCCAGACCCA**

55 Después de amplificación mediante PCR, el producto se purificó usando el kit QIAquick, se digirió con *XbaI* y *NotI*, se volvió a purificar con el kit QIAquick, y se ligó dentro del pBGSrCOX2 plásmido el cual había sido también digerido con *XbaI* y *NotI*. El nuevo constructo se le designó como pBGSrCOX2/Her2. De una manera similar, pueden generarse constructos adicionales que contienen secuencias Her2neu modificadas.

60 En otro ejemplo, se construyó un vector de suministro de gen plásmido que expresa el antígeno gp100 y un ribozima específico para COX-2. Específicamente, el antígeno gp100 se clonó por ampliación mediante PCR, usando cebadores oligonucleótidos siguientes que incorporan sitios de restricciones *XbaI* y *NotI* flanqueantes.

gp100Fwd

5'ATATATATCTAGACACAATGGATCTGGTGCTAAAAAGATG

5

gp100Rev

5'TATATAGCGGCCGCTCAGACCTGCTGCCCACTGAGGAG

10

Después de amplificación mediante PCR, el producto se purificó usando el kit QIAquick, se digirió con *XbaI* y *NotI*, se volvió a purificar con el kit QIAquick, y se ligó dentro del pBGSrCOX2 plásmido el cual había sido también digerido con *XbaI* y *NotI*. El nuevo constructo se le designó como pBGSrCOX2/gp100.

15 Como alternativa, pueden insertarse las cajas pol III/ribozima y cajas de antígeno dentro de una diversidad de otros vectores de suministro de genes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus) por un experto en la técnica usando las directrices de esta invención y las referencias incorporadas en su totalidad.

## Ejemplo 8

20

*Modelos animales para evaluación in vivo de la eficacia terapéutica*

Pueden usarse diversos modelos de tumor *in vivo* para la evaluación de la eficacia terapéutica de estos vectores recombinantes. Por ejemplo, usando un modelo de melanoma de ratón singénico, se implantaron células B16F10 sin modificar en ratones C57BL/6 a dosis de  $1 \times 10^5$  células o bien subcutáneamente para desarrollar un nódulo de tumor sólido, o bien intravenosamente para desarrollar metástasis pulmonar, o ambos. Se ha demostrado que las células de melanoma de ratón B16F10 expresan gp100, un antígeno de tumor asociado a melanoma. Se ha demostrado que las células de melanoma humano expresan gp100 y una respuesta anticuerpo contra gp100 está asociada con respuestas clínicas. Se han clonado y caracterizado los genes humano y de ratón para gp100. Los nuevos vectores de suministro de genes que expresan una combinación de antígeno de tumor (por ejemplo, gp100) y ARN antisentido/ribozima (por ejemplo, antisentido específico para COX2, TGF- $\beta$ ) pueden evaluarse para determinar su eficacia *in vivo* tal como se describe de manera general por Karavodin y otros (*Human Gene Therapy*, vol. 9, págs. 2231-2241, (1998)). Específicamente, dichos vectores se evaluaron para determinar la actividad terapéutica *in vivo* mediante la implantación subcutáneamente (s.c.) de  $1 \times 10^5$  células de melanoma B16F10 dentro del abdomen ventral inferior de ratones hembra de 6-8 semanas de edad. Se dejó formar un nódulo de tumor palpable en el sitio de inyección durante 7-10 días o hasta que el nódulo tenía 2-5 mm de diámetro. La medición y registro del diámetro del tumor o del volumen del tumor s.c. antes, durante y después del tratamiento se usó para indicar la eficacia terapéutica. El sacrificio del animal y la extracción de los pulmones con el fin de enumerar visualmente los focos de células de tumor se usaron como una medición de la respuesta anti-tumor sistémica. Como alternativa, pueden ensayarse anticuerpos anti-tumor en suero o la actividad de célula T citolítica (CTL) en masa *in vitro*, usando vías inmunológicas convencionales para determinar respuestas terapéuticas sistémicas. El vector terapéutico puede inyectarse intratumoralmente, peritumoralmente, o una combinación de ambos en volúmenes tales como de 50-100  $\mu$ l. Los esquemas de tratamiento pueden ser de una o dos inyecciones por día administradas durante 5 a 7 días consecutivos de vector, es decir  $1 \times 10^8$  cfu/ml ó 1-100  $\mu$ g o más.

45 Como alternativa, puede llevarse a cabo la evaluación de un vector de suministro de gen que expresa el antígeno del tumor Her2/neu y un inhibidor antisentido/ribozima (por ejemplo, específico para COX-2) en un modelo de ratón transgénico Her2/neu tal como ha sido descrito por Boggio y otros (*J. Exp. Med.*, vol. 188, págs. 589-596, (1998)). En resumen, los ratones transgénicos desarrollan tumores mamarios espontáneos que implicarían a todas las glándulas mamarias aproximadamente a los 33 meses de edad. En una aplicación de vacunación, a los ratones se les administraron inyecciones del vector terapéutico intramuscularmente o subcutáneamente antes del desarrollo de tumores palpables. Se usaron diversos esquemas de vacunación (por ejemplo, una vez a la semana durante 4-6 semanas, o una vez al mes durante 3-4 meses), con 50-100  $\mu$ l de vector vírico a unos títulos de  $1-100 \times 10^8$  cfu/ml ó 1-100  $\mu$ g de un ADN vector. Estos vectores pueden usarse igualmente en una aplicación terapéutica en la que se inyectan ratones con tumores existentes. El vector terapéutico se inyectó intratumoralmente, peritumoralmente, o una combinación de ambos, en volúmenes de 50-100  $\mu$ l. Se usaron diversos esquemas de tratamiento, por ejemplo, incluyendo una o dos inyecciones por día administradas durante 5 a 7 días consecutivos de vector, es decir  $1 \times 10^8$  cfu/ml o más.

A partir de lo anterior, se comprenderá que, aunque se han descrito aquí realizaciones específicas de la invención con fines ilustrativos, pueden llevarse a cabo diversas modificaciones sin desviarse de las reivindicaciones adjuntas.

60

65

# ES 2 300 261 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una caja de expresión, que comprende un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe *in vivo*, forma un ARN de doble hebra que induce la producción de interferón, en la que la caja de expresión está seleccionada entre el grupo constituido por:
- (a) una caja de expresión que, cuando se transcribe *in vivo*, forma ARN auto-complementario; y
- 10 (b) una caja de expresión que comprende un primer promotor ligado de manera operable a una primera molécula de ácido nucleico, y un segundo promotor ligado de manera operable a una segunda molécula de ácido nucleico, en la que la primera y segunda moléculas de ácido nucleico, cuando se transcriben *in vivo*, forman un ARN de doble hebra que induce la producción de interferón.
- 15 2. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha caja comprende una caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1(a) y no la reivindicación 1(b).
3. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha caja comprende una caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1(b) y no la reivindicación 1(a).
- 20 4. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ARN no está traducido dentro de la proteína *in vivo*.
5. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho promotor es un promotor pol I o uno pol III.
- 25 6. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho promotor pol III es un promotor de Adenovirus VA1.
- 30 7. Una caja de expresión, que comprende un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico antisentido o ribozima que, cuando se transcribe *in vivo*, promueve la apoptosis, que comprende además un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe *in vivo*, forma un ARN de doble hebra que induce la producción de interferón.
- 35 8. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés.
9. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho promotor que está ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés es un promotor pol II.
- 40 10. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho polipéptido promueve la apoptosis.
11. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho polipéptido codifica un antígeno a partir de un agente patógeno.
- 45 12. Una caja de expresión, que comprende un primer promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe *in vivo*, forma un ARN de doble hebra que induce la producción de interferón, y un segundo promotor ligado de manera operable a una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno a partir de un agente patógeno.
- 50 13. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que dicho agente patógeno es un virus.
14. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho virus está seleccionado entre el grupo constituido por VIH, HSV, HBV, HCV, HPV y FIV.
- 55 15. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que dicho agente patógeno es una bacteria, parásito u hongo.
- 60 16. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que dicho agente patógeno es un tumor.
17. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho polipéptido es una citocina.
- 65 18. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 17, en la que dicha citocina está seleccionada entre el grupo constituido por IL-2, IL-12, IL-15 y gamma-interferón.

## ES 2 300 261 T3

19. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que dicho promotor adicional es un promotor pol II.

5 20. La caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 9 ó 19, en la que dicho promotor está seleccionado entre el grupo constituido por CMV, SV40, MoMLV LTR y RSV LTR.

21. Un vector de suministro de gen, que comprende una caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1.

10 22. El vector de suministro de gen de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicho vector es un plásmido, un retrovirus recombinante, un herpesvirus recombinante, un poxvirus recombinante, un adenovirus recombinante, un parvovirus recombinante, un alfavirus recombinante, un polioma virus recombinante, o un sistema de de iniciación de vector en capas eucariótico.

15 23. Una célula que contiene una caja de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 o un vector de suministro de gen de acuerdo con la reivindicación 21.

24. Un vector de suministro de gen de acuerdo con la reivindicación 21, para uso en medicina.

20 25. Uso de un vector de suministro de gen de acuerdo con la reivindicación 21, en la fabricación de un medicamento para la estimulación de una respuesta inmune a un antígeno seleccionado dentro de un huésped deseado.

25

30

35

40

45

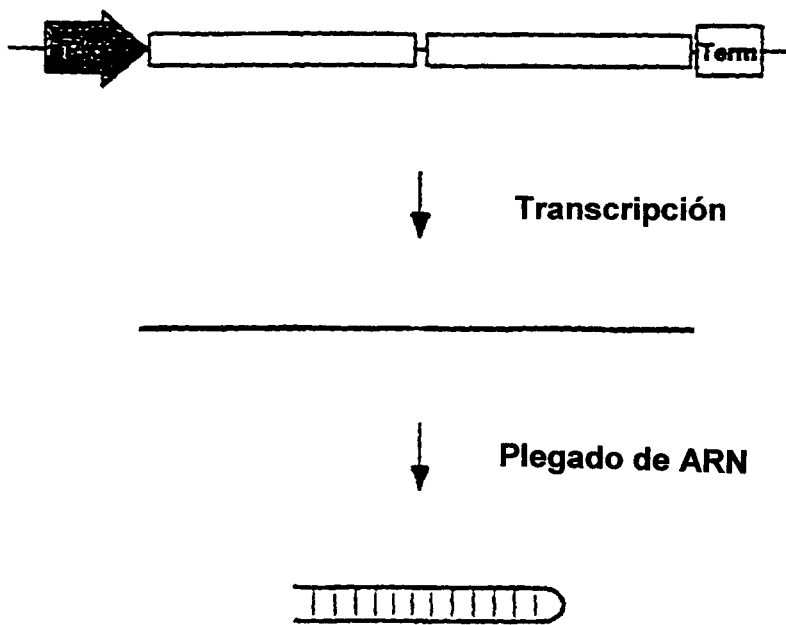
50

55

60

65

**Caja de expresión de ARNs I: ARN de horquilla**



**Figura 1**

Caja de expresión de ARNs II: ARNs “verdadero”

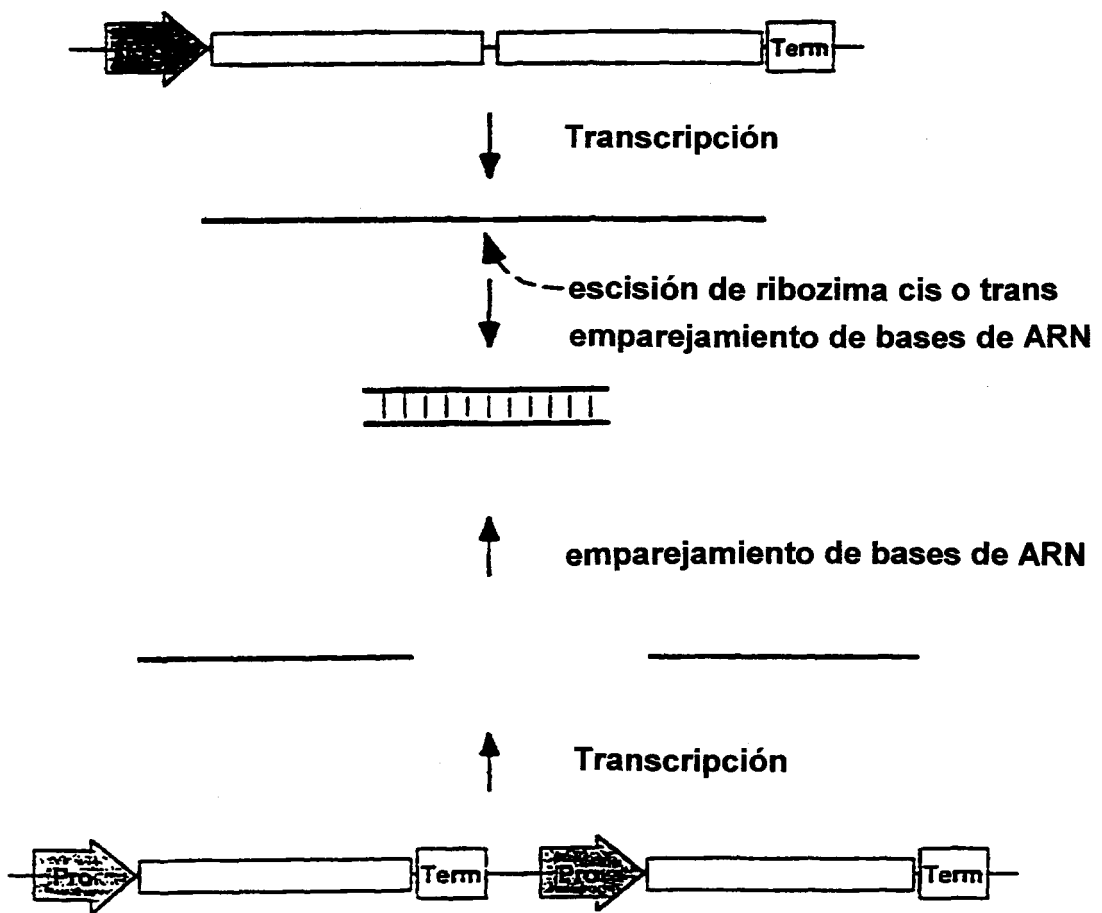
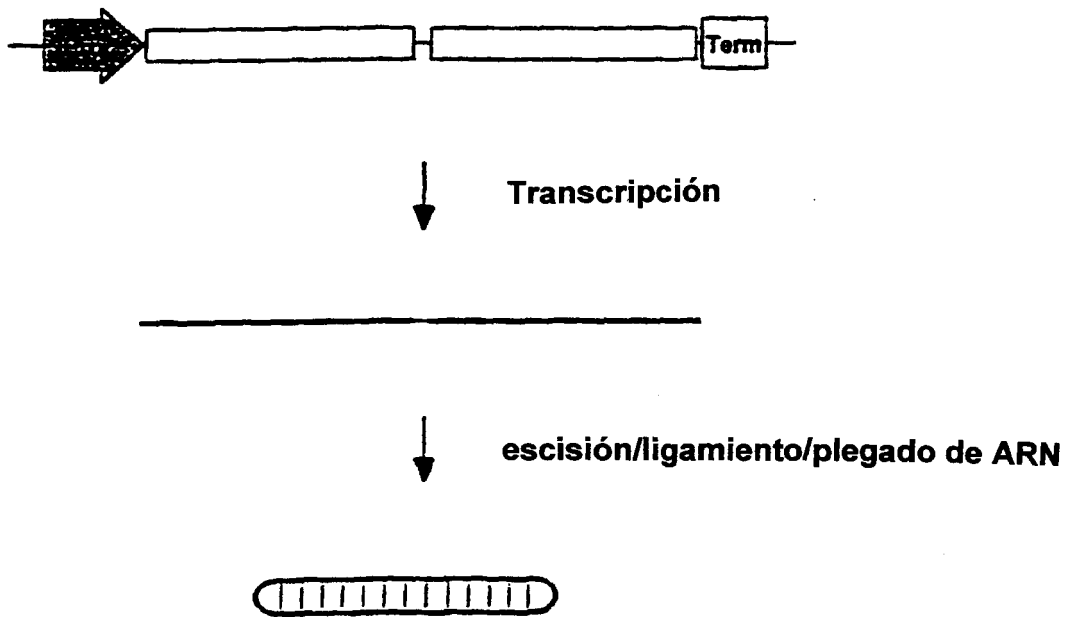


Figura 2

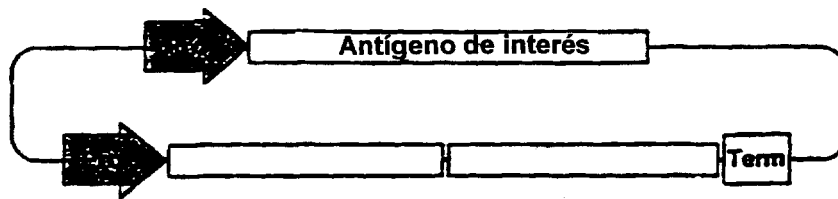
**Caja de expresión de ARNs III: ARN circular**



**Figura 3**

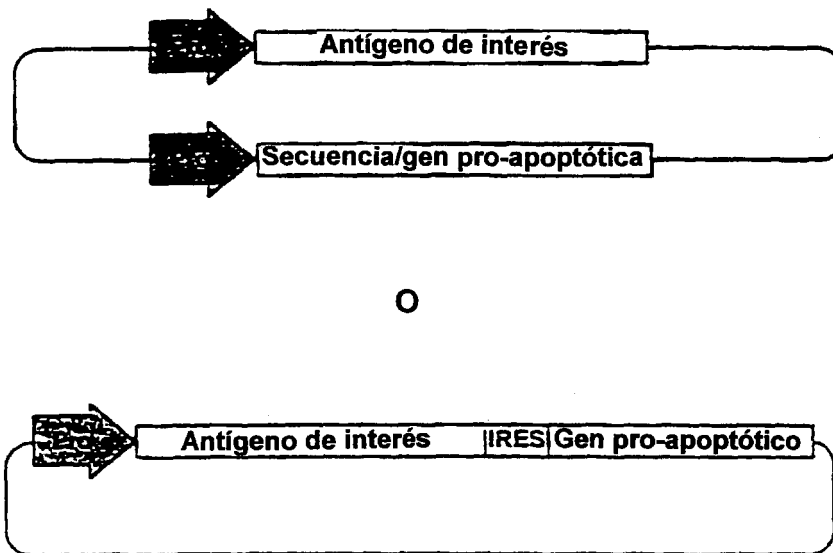


**Vector plásmido con ARNs y cajas de antígeno**



**Figura 4**

**Vectores pro-apoptóticos con cajas de antígeno**



O

**Figura 5**

# ES 2 300 261 T3

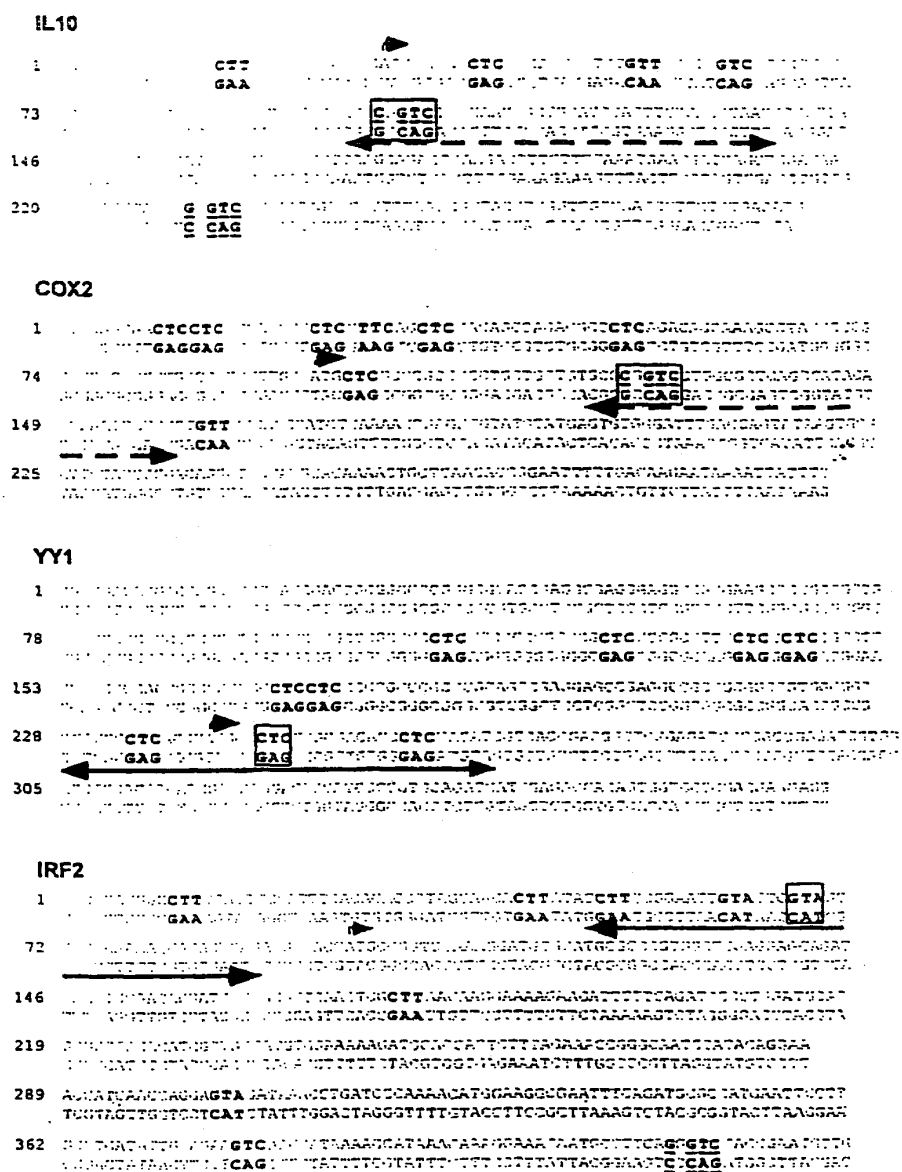


Figura 6

**Leyenda**

- ▶ :metionina de partida
- ↔ :secuencia complementaria para el ribozima de cabeza de martillo
- ↔ - - ↔ :secuencia complementaria para el ribozima de horquilla
- Secuencias encajonadas:** secuencia diana para el ribozima elegido
- Caracteres en negrita:** secuencias diana para ribozimas de cabeza de martillo
- Caracteres en negrita y subrayados:** secuencias diana tanto para ribozimas de cabeza de martillo como de horquilla