



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 510**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/145** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61K 39/205** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00917245 .3**  
86 Fecha de presentación : **17.04.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1171454**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

54 Título: **Ácidos nucleicos y polipéptidos de lisavirus quiméricos.**

30 Prioridad: **15.04.1999 US 129501 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**  
**25/28, rue du Docteur Roux**  
**75015 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Jacob, Yves;**  
**Perrin, Pierre;**  
**Tordo, Noel y**  
**Bahloul, Chokri**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 267 510 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

Ácidos nucleicos y polipéptidos de lisavirus quiméricos.

5 La presente invención se refiere a moléculas portadoras que contienen ácidos nucleicos de lisavirus quiméricos, y polipéptidos y proteínas quiméricos codificados por estos ácidos nucleicos. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden ácidos nucleicos y proteínas de lisavirus quiméricos.

10 La rabia es una enfermedad encefalopática provocada por elementos del género *Lyssavirus* dentro de la familia *Rhabdoviridae*. La rabia infecta a todos los animales de sangre caliente e invariablemente es casi mortal en seres humanos si no son tratados. Con base a las comparaciones de secuencias nucleotídicas y análisis filogenéticos, el género de *Lyssavirus* se ha dividido en 7 genotipos (GT). GT1 incluye las cepas clásicas de vacuna y virus de rabia, mientras que GT2 a GT7 corresponden a virus relacionados con rabia que incluyen virus de murciélago de Lagos (GT2); virus de Mokola (GT3); virus de Duvenhage (GT4); lisavirus de murciélago europeo 1 (EBL-1: GT5); lisavirus de murciélago europeo 2 (EBL-2: GT6); y lisavirus de murciélago australiano (GT7).

15 En base en la antigenicidad, el género *Lyssavirus* se dividió primero en cuatro serotipos. Más recientemente, este género se dividió en dos grupos principales de acuerdo con la reactividad cruzada del anticuerpo neutralizante del virus (VNAb): El grupo 1 consiste en GT1, GT4, GT5, GT6, y GT7, mientras que el grupo 2 consiste en GT2 y GT3. Los virus del grupo 2 no son patógenos cuando se inyectan periféricamente en ratones. La virulencia de los lisavirus depende, al lo menos en parte, de la glicoproteína presente en el recubrimiento viral. De manera interesante, las glicoproteínas de los virus del grupo 2 muestran un alto grado de identidad, en la región que contiene aminoácidos que empeñan un papel importante en la patogenicidad, con la secuencia correspondiente de virus GT1 no virulentos (véase, por ejemplo Coulon *et al.*, 1998, "An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons *in vivo* and *in vitro*", *J. Virol.* **72**:273-278).

20 La glicoproteína del virus de rabia (G) está compuesta de un dominio citoplásmico, un dominio transmembránico y un ectodominio. La glicoproteína es un trímero, con los ectodominios expuestos en la superficie del virus. El ectodominio está involucrado en la inducción de tanto la protección como la producción de VNAb después de la vacunación, tanto antes como después de la exposición al virus. Por lo tanto, se ha dado mucha atención a G en el desarrollo de vacunas de subunidad de rabia. De manera estructural, G contiene tres regiones, la región aminoterminal (N-terminal), una región de "bisagra" o "enlazadora", y la región carboxiterminal (C-terminal). (Véase figura 1).

25 Como se ilustra en la figura 1, generalmente se piensa que el ectodominio de la glicoproteína (G) tiene dos sitios principales antigénicos, el sitio II y el sitio III, los cuales son reconocidos por aproximadamente 72,5% (sitio II) y 24% (sitio III) de anticuerpos monoclonales neutralizantes (MAb), respectivamente. El sitio II está localizado en la mitad N-terminal de la proteína, y el sitio III está localizado en la mitad C-terminal de la proteína. Las dos mitades están separadas mediante una bisagra flexible alrededor de la región lineal (aminoácido 253 a 257).

30 El ectodominio de G contiene además un sitio menor (sitio a), y varios epítomos reconocidos por MAbs individuales (I: resto 231 de aminoácidos; V: resto 294, y VI: resto 264) (5, 10, 18, 21 ref. 2). El sitio II es conformacional y discontinuo (restos 34 a 42 de aminoácidos y restos 198 a 200 de aminoácidos, los cuales están asociados mediante puentes de disulfuro), mientras que el sitio III es conformacional y continuo (restos 330 a 338). La lisina 330 y arginina 333 en el sitio III juegan un papel importante en neurovirulencia, y pueden estar implicadas en el reconocimiento de receptores neuronales (véase, por ejemplo, Coulon *et al.*, *supra*, y Tuffereau *et al.*, 1998, "Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells", *J. Virol.* **72**:1085-1091). Los sitios II y III parecen estar próximos entre sí en la estructura tridimensional, y expuestos en la superficie de la proteína (Gaudin, Y., 1997, "Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones", *J. Virol.* **71**:3742-3750). Sin embargo, a pH bajo, la molécula de G toma una conformación inactiva de fusión en la cual el sitio II no es accesible para MAbs, mientras que los sitios a y III permanecen más o menos expuestos (Gaudin, Y. *Et al.*, 1995, "Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation", *J. Virol.* **69**:5528-5533; Gaudin, Y., *et al.*, 1991, "Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein", *J. Virol.* **65**:4853-4859).

35 Además, varias regiones distribuidas a lo largo del ectodominio están involucradas en la inducción de células auxiliares T (Th) (MacFarlan, R. *et al.*, 1984, "T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides", *J. Immunol.* **133**:2748-2752; Wunner, W. *et al.* 1985, "Localization of immunogenic domains on the rabies virus glycoprotein", *Ann. Inst. Pasteur*, **136 E**:353-362). Basándose en estas propiedades estructurales e inmunológicas, se ha sugerido que la molécula de G puede contener dos partes inmunológicamente activas, cada una potencialmente capaz de inducir tanto VNAb como células Th (Bahloul, C. *et al.*, 1998, "DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses", *Vaccine* **16**:417-425).

40 Las vacunas actualmente disponibles consisten o derivan principalmente de virus GT1, contra los cuales dan protección. Muchas cepas de vacunas no son efectivas contra GT4, y ninguna es efectiva contra GT2 o GT3. Sin embargo, la protección producida contra GT4 a 6 depende de la cepa de la vacuna. Por ejemplo, la protección de lisavirus de murciélago europeo (GT5 y GT6), cuyo aislamiento se ha hecho más frecuente en años recientes, mediante la cepa de

vacuna de rabia PM (Pitman-Moore) no es muy robusta. La cepa PM induce una protección contra EBL1 (GT5) más débil que la protección que proporciona contra la cepa PV (virus de Pasteur).

Debido, en parte, a la importancia de la rabia en la salud mundial, existe una continua necesidad de proporcionar vacunas seguras, efectivas, y de acción rápida, y composiciones inmunogénicas para tratar y prevenir esta enfermedad. Muchos enfoques distintos del uso de preparaciones de virus intactos se han propuesto y/o perseguido para proporcionar una composición inmunogénica efectiva, y rentable específica para virus de rabia. Por ejemplo, como se discutió anteriormente, se han desarrollado vacunas de subunidad. También, se han propuesto vacunas con cierto valor que podrían generar una respuesta inmune a múltiples serotipos de rabia, así como otros diversos patógenos (Comisión Europea COST/STD-3, 1996 "Advantages of combined vaccines" *Vaccine* **14**:693-700). De hecho, se ha dado a conocer recientemente el uso de una vacuna combinada de difteria, tétanos, tos ferina de células intactas, poliomieltis inactivada, y rabia (Lang J. *et al.*, 1997, "Randomised Feasibility trial of pre-exposure rabies vaccination with DTP-IPV in infants" *The Lancet* **349**:1663-1665). Las vacunas combinadas que incluyen rabia también se han utilizado para inmunización de perros (virus de moquillo, hepatitis, leptospirosis y parvovirus), gatos (virus de panleucopenia, calici- y parvo-felino) y ganado (virus de la glosopeda) (Pastoret, P-P. *et al.*, 1997, "Vaccination against rabies" en *Veterinary Vaccinology*, Pastoret, P-P. *et al.*, Eds. (Elsevier): 616-628 23).

Además, las vacunas producidas en cultivos de tejidos son costosas de producir a pesar de algunos intentos para reducir sus costes. Por consiguiente, las vacunas de ADN, las cuales son menos costosas de producir y ofrecen muchas ventajas, constituirían una alternativa valiosa. Los informes de vacunaciones de ADN incluyen inoculación en ratones con plásmidos que contienen el gen que codifica la glicoproteína de virus de la rabia (G). Dicha inoculación es muy potente induciendo respuestas inmunes humorales y celulares en asociación con la protección contra una exposición intracerebral (véase, por ejemplo, Lodmell, D. *et al.*, 1998, "DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus" *Science Med.* **4**:949-952; Xiang, Z. *et al.*, 1994, "Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus", *Virol.* **199**:132-140 y Lodmell, D. *et al.*, 1998, "Gene gun particle mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection", *Vaccine* **16**, 115). La inmunización mediante ADN también puede proteger a primates no humanos contra rabia (Lodmell *et al.*, 1998, *supra*).

También se pueden citar los documentos de Ballet C. *et al.*, 1999 (*J. Virol.* **73** (1): 225-233) y Bahlool C. *et al.*, 1998 (*Vaccine*, 1604): 417-425), que describen vectores plasmídicos que contienen secuencias polinucleotídicas que codifican el sitio III o el sitio II de la glicoproteína del lisavirus y el antígeno del lisavirus distinto de un sitio III o II, y sus usos como vacuna para inducir protección con la exposición a lisavirus.

Debido a que la administración de ADN plasmídico genera respuestas inmunes humorales y celulares, incluyendo producción de linfocitos T citotóxicos (CTL) (para un repaso, véase Donnelly, J. *et al.*, 1997, "DNA Vaccines", *Annu. Rev. immunol.* **15**:617-648), y se basa en una tecnología versátil, la inmunización con ADN plasmídico puede ofrecer un prospecto satisfactorio para vacunas multivalentes. Sin embargo, se cree que el uso de una mezcla de plásmidos o un plásmido individual que exprese varios antígenos induce problemas de interferencia tanto en niveles transcripcionales como inmunológicos (Thompson, S. *et al.*, 1998, "Delivery of multiple CD8 cytotoxic cell epitopes by DNA Vaccination", *J. immunol.* **160**:1717-1723). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar y producir vacunas a base de ADN multivalentes que sean efectivas contra rabia y otras diversas enfermedades; que sean seguras; y que sean rentables de producir y utilizar.

La presente invención proporciona una molécula portadora, tal como un vector de expresión de ADN, que comprende una secuencia de polinucleotídica quimérica, en la que dicha secuencia polinucleotídica quimérica comprende una secuencia que codifica una parte de una glicoproteína que contiene al menos el sitio III de la glicoproteína de lisavirus, y comprende además una secuencia que codifica un antígeno heterólogo distinto de un antígeno procedente de un lisavirus. La molécula portadora de la invención se puede usar como una composición inmunogénica, o como una parte de una composición inmunogénica, para provocar la respuesta inmune deseada. Se describe que la respuesta inmune deseada puede ser una respuesta protectora contra los virus de la rabia o virus relacionados de la rabia, así como también contra otros organismos o polipéptidos. De este modo, las moléculas portadoras de la invención se pueden usar para obtener una composición inmunogénica, que se puede usar para tratar a un individuo. La molécula portadora también se puede usar para producir un polipéptido quimérico.

La presente invención también proporciona un polipéptido que está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos presente en la molécula portadora de la invención. Se describe que el polipéptido de la invención se puede usar para provocar una respuesta inmunogénica en un individuo. De este modo, el polipéptido quimérico de la invención se puede usar para obtener una composición inmunogénica, que se puede usar para tratar a un individuo.

La presente invención incluye composiciones inmunogénicas que comprenden la molécula portadora de la invención que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido quimérico (o de fusión), o el polipéptido quimérico así codificado, que se puede usar para provocar la respuesta inmune.

Se han creado secuencias de ácidos nucleicos quiméricas que codifican polipéptidos quiméricos que inducen respuestas inmunogénicas en individuos. Como se discutió anteriormente, se sabe en la técnica que el ADN puede producir tanto respuestas inmunes humorales como celulares. Al hacer esto, es posible que los propios ácidos nucleicos

puedan inducir al menos parte de la respuesta inmunogénica. De esta forma, los ácidos nucleicos quiméricos y las moléculas portadoras pueden proporcionar o promover una respuesta inmunogénica.

Como se utiliza en la presente, “quimérico” y “fusión” se utilizan de manera intercambiable y con referencia tanto a ácidos nucleicos como a polipéptidos. Estos términos se refieren a ácidos nucleicos y polipéptidos que comprenden secuencias que no se encuentran de manera natural asociadas entre sí en el orden o contexto en el cual son colocados de acuerdo con la invención. Por ejemplo, una glicoproteína quimérica puede comprender una región C-terminal de una rabia GT1 y una región N-terminal de una rabia GT3 o GT5. Además, un ácido nucleico quimérico puede comprender un segmento corto de una porción de un genotipo de rabia enlazado directamente a otro segmento del mismo genotipo, en el que los dos segmentos no son naturalmente adyacentes entre sí. De esta forma, un polipéptido o ácido nucleico quimérico o de fusión no comprende la secuencia natural de un virus de rabia en su totalidad, y puede comprender secuencias heterólogas (de otra cepa de lisavirus, o de otro organismo en conjunto). Las proteínas de fusión/quiméricas tienen los dos (o más) segmentos heterólogos unidos a través de enlaces peptídicos normales, mientras que los ácidos nucleicos de fusión/quiméricos tienen los dos (o más) segmentos heterólogos unidos a través de enlaces fosfodiéster normales.

En un aspecto de la invención, los ácidos nucleicos quiméricos contenidos en la molécula portadora de la invención comprenden a) una secuencia que codifica una parte de una glicoproteína que contiene al menos el sitio III de una glicoproteína de lisavirus, y comprende además b) una secuencia que codifica un dominio transmembránico (o una porción del mismo que sea funcionalmente equivalente al dominio transmembránico) de una glicoproteína transmembránica. En realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, los ácidos nucleicos quiméricos contenidos en la molécula portadora de la invención comprenden además una secuencia que codifica el dominio citoplásmico de dicha glicoproteína de dicho lisavirus. En realizaciones también preferidas de este aspecto de la invención, los ácidos nucleicos quiméricos comprenden además una secuencia que codifica al menos la mitad C terminal de la glicoproteína del lisavirus. Se describe que la secuencia que codifica el dominio transmembránico (o porción del mismo) es una secuencia de una glicoproteína transmembránica de un lisavirus, o de una glicoproteína transmembránica distinta de una glicoproteína procedente de un lisavirus. Por ejemplo, puede ser de una glicoproteína de otro organismo, o de una proteína transmembránica que no sea una glicoproteína. En realizaciones, la secuencia que codifica el dominio transmembránico (o porción del mismo) y la secuencia que codifica el dominio citoplásmico son del mismo lisavirus. La secuencia que codifica el sitio III y el dominio citoplásmico son de la misma glicoproteína de lisavirus.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el ácido nucleico quimérico contenido en la molécula portadora de la invención incluye secuencias que codifican una secuencia de sitio III de una glicoproteína de lisavirus, un antígeno heterólogo distinto de un antígeno procedente de un lisavirus, una secuencia de sitio II de una glicoproteína de lisavirus, un dominio transmembránico de una proteína transmembránica, y un dominio citoplásmico de una proteína transmembránica. Se describe que el ácido nucleico quimérico de la invención comprenda secuencias que codifiquen una proteína antigénica (o porción antigénica de la misma), especialmente entre las secuencias que codifican los sitios II y III.

Se describe que las secuencias que codifican el sitio II y sitio III son secuencias que abarcan el sitio II y sitio III de una glicoproteína de un lisavirus, respectivamente. En realizaciones, la secuencia que codifica el sitio III no es idéntica a ninguna de las secuencias conocidas del sitio III de los lisavirus, pero muestra por lo menos 60% de identidad con una de las secuencias de lisavirus, que se extiende 30 pares de bases a cada lado de la secuencia de sitio III. Los análisis de secuencias y estudios filogenéticos se realizan utilizando diferentes paquetes: GCG (versión 8.1, 1994), CLUSTAL W (Thompson, 1994 #1040), PHYLIP (versión 3.5: Felseustein, 1993, #1042), y GDE (Genetic Data Environment, Versión 2.2: Institute Pasteur Scientific Computer Service - S.I.S).

En esta invención, se describe que la secuencia de sitio III es la de la cepa PV del virus de la rabia, o muestra por lo menos 60% de identidad con esa secuencia de sitio III. Se obtienen resultados muy satisfactorios con los siguientes constructos, representados en la figura 1: PV-PV o PV III o EBL1-PV o MOK-PV. El módulo base debe de contener por lo menos una secuencia de PV III.

Se ha encontrado que la presencia del sitio III de las glicoproteínas del lisavirus mejora la inmunogenicidad de composiciones que comprenden la glicoproteína, o porciones de la misma. La presente invención incluye ácidos nucleicos quiméricos que comprenden una secuencia que codifica el sitio III de una glicoproteína de lisavirus que está enlazada funcional, operativa y físicamente a una secuencia homóloga o heteróloga que codifica un dominio transmembránico de secuencia natural o sintética que codifica una proteína transmembránica (o una porción de la misma que sea funcionalmente equivalente al dominio transmembránico), y una secuencia que codifica un dominio citoplásmico (o una porción del mismo que sea suficiente para existir citoplásmicamente de manera estable) procedente de glicoproteína. La glicoproteína es la de un virus, y particularmente la de un lisavirus. Las secuencias de ácidos nucleicos quiméricos pueden proceder todas del mismo lisavirus, se pueden seleccionar de diversos lisavirus, o pueden ser tanto de lisavirus como de otros virus y organismos. En realizaciones preferidas, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el sitio III y el dominio citoplásmico son del mismo lisavirus.

El ácido nucleico quimérico de la molécula portadora de la invención comprende una secuencia que codifica un antígeno heterólogo, o una porción antigénica del mismo, distinto de un antígeno procedente de un lisavirus. Por ejemplo, se describe que el ácido nucleico quimérico puede comprender, además de los elementos antes expuestos, una secuencia que codifica un epítipo de leishmania, difteria, tétanos, poliomiélitis, virus de la glosopeda, virus del

herpes, virus de moquillo en caninos, parvovirus y virus de inmunodeficiencia felina. En una realización preferida, el ácido nucleico quimérico contenido en la molécula portadora de la invención comprende una secuencia que codifica un antígeno tumoral. La secuencia que codifica el polipéptido heterólogo (o porción antigénica del mismo) se fusiona (en marco) con la secuencia codificante arriba detallada, en cualquier sitio que dé como resultado un producto funcional.

5 De esta forma, se describe que el ácido nucleico quimérico de la invención puede incluir la secuencia codificante para múltiples determinantes antigénicos, incluyendo, pero sin limitarse a, epítomos del virus de rabia.

La molécula portadora de la invención se puede usar para obtener una composición inmunogénica. La composición inmunogénica puede constar esencialmente del ácido nucleico quimérico, o puede comprender el ácido nucleico quimérico además de otros componentes, incluyendo, pero sin limitarse a, adyuvantes, excipientes, estabilizadores, vectores supramoleculares como se describen en la patente europea nº 696.191 (Samain *et al.*), y antígenos. Los componentes normalmente incluidos en composiciones inmunogénicas son bien conocidos por el experto en la técnica, ya que son las técnicas para preparar composiciones inmunogénicas, tales como vacunas. Por lo tanto, el experto en la técnica puede conseguir la preparación de la composición inmunogénica utilizando técnicas bien conocidas, sin

10  
15 indebida o excesiva experimentación.

El núcleo de la molécula portadora puede ser cualquier molécula que se sepa que es útil para mantener, y preferentemente expresar, un ácido nucleico que codifique un polipéptido heterólogo. El núcleo de la molécula portadora puede ser, por ejemplo, un plásmido, un fago, un fagómido, un cósmido, un virus o un cromosoma artificial de levadura (YAC). Dichas moléculas portadoras de núcleo también se denominan habitualmente como vectores o vectores de expresión, y son bien conocidas por el experto en la técnica y están ampliamente disponibles al público. La molécula portadora de la invención se puede proporcionar como un ácido nucleico desnudo, o empaquetado, tal como en cubierta o caparazón viral. La molécula portadora se puede proporcionar como ADN o ARN. Las formas modificadas de estos dos ácidos nucleicos se incluyen dentro del alcance de la invención. La molécula portadora puede comprender

20  
25 secuencias que permiten la transcripción de los ácidos nucleicos quiméricos. Estas secuencias están operablemente enlazadas con los ácidos nucleicos quiméricos de la invención (es decir, su operación/función afecta directamente a la expresión del ácido nucleico quimérico). En realizaciones, estas secuencias incluyen elementos reguladores que permiten la expresión controlada de los ácidos nucleicos quiméricos, de modo que la expresión de los ácidos nucleicos quiméricos se pueda regular, por ejemplo, retardando la expresión hasta que se desee, o expresando los ácidos nucleicos quiméricos en ciertos tejidos o tipos de células solamente. Dichos elementos de control son conocidos por el experto en la técnica, y se pueden insertar o remover de manera habitual de las moléculas portadoras según se desee o sea necesario, utilizando reactivos y técnicas de biología molecular bien conocidos.

30

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína o polipéptido quimérico que es codificado y/o expresado por la secuencia de ácidos nucleicos quiméricos de la molécula portadora de la presente invención.

35

Se describe que el sitio II y sitio III se pueden obtener a partir de cualquier lisavirus, y ambos pueden proceder, pero no necesariamente, del mismo lisavirus. Además, la secuencia del sitio II y/o sitio III no tiene que ser idéntica a un sitio II o sitio III de una glicoproteína de un lisavirus. La secuencia de uno o ambos no es idéntica a ninguna de las secuencias de sitio II o sitio III conocidas de los lisavirus, pero muestra por lo menos 60% de identidad con una de las secuencias de lisavirus, que se extiende 10 restos a cada lado de la secuencia de sitio II o sitio III.

40

La invención también proporciona un polipéptido quimérico con múltiples antígenos que incluyen, pero no se limitan a, antígenos de la rabia. El polipéptido quimérico se puede utilizar como, o como parte de, una composición inmunogénica, tal como una vacuna. Así, el polipéptido de la invención es un polipéptido inmunogénico que contiene por lo menos una región (la cual puede ser aislada como un fragmento) que induce una respuesta inmunogénica. En realizaciones en las que están presentes un sitio II, un sitio III, y otro determinante antigénico, se prefiere, aunque no necesariamente, que el otro determinante antigénico esté localizado entre el sitio II y sitio III en la secuencia de aminoácidos lineales (primarios) del polipéptido. Un antígeno preferido distinto del sitio II o sitio III es un antígeno tumoral de una célula tumoral.

45  
50

Las moléculas portadoras y polipéptidos quiméricos (las "moléculas") de la invención se pueden aislar y/o purificar. Los términos "aislado" y "purificado" se refieren a un nivel de pureza que se puede conseguir utilizando tecnología actual. Las moléculas de la invención no necesitan ser absolutamente puras (es decir, no contienen absolutamente ninguna molécula de otras macromoléculas celulares), sino que deben ser suficientemente puras de modo que un experto en la técnica reconozca que ya no están presentes en el entorno en el cual se encontraron originalmente (es decir, el medio celular). De esta forma, una molécula purificada o aislada es aquella que se ha eliminado de al menos alguna otra macromolécula presente en el entorno natural en el cual se encontró. Las moléculas de la invención están esencialmente purificadas y/o aisladas, lo que significa que la composición en la cual están presentes está casi completamente, o incluso absolutamente, libre de otras macromoléculas encontradas en el entorno en el cual se encontraron originalmente las moléculas de la invención. De esta forma, el aislamiento y purificación no ocurre por adición o eliminación de sales, disolventes o elementos de la tabla periódica, sino deben incluir la eliminación de al menos algunas macromoléculas.

55  
60

Como se puede ver a partir de la descripción anterior, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la proteína quimérica o molécula portadora de la invención. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden utilizar para obtener una composición inmunogénica. La composición inmunogénica puede constar esencialmente del polipéptido quimérico, o puede comprender el polipéptido quimérico además de

65

## ES 2 267 510 T3

otros componentes, incluyendo, pero sin limitarse a, adyuvantes, excipientes, estabilizadores, vectores supramoleculares (documento EP 696.191, Samain *et al.*) y antígenos. Los componentes normalmente incluidos en composiciones inmunogénicas son bien conocidos por los expertos en la técnica, ya que son las técnicas para la preparación de composiciones inmunogénicas, tales como vacunas. Por lo tanto, el experto en la técnica puede conseguir la preparación de la composición inmunogénica utilizando técnicas bien conocidas, sin indebida o excesiva experimentación.

Se describe que la composición inmunogénica de acuerdo con la invención es una composición que provoca una respuesta inmune por lo menos para lisavirus. Debido a que las moléculas portadoras y polipéptidos de la invención pueden comprender determinantes antigénicos de los diversos genotipos de lisavirus en diferentes combinaciones, la composición inmunogénica de la invención puede proporcionar un amplio espectro de protección contra lisavirus que inducen encefalomielitis, incluyendo virus de la rabia. Además, debido a que las secuencias que codifican múltiples epítomos de lisavirus se pueden incluir en un ácido nucleico quimérico, la composición inmunogénica de la invención puede proporcionar una respuesta inmune a múltiples genotipos (que incluye a todos) de lisavirus. Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención provoca una respuesta inmune tanto celular como humoral.

Además, la composición inmunogénica de la invención proporciona epítomos procedentes no solamente de lisavirus, sino también de cualquier otro organismo (incluyendo antígenos producidos por células humanas, tales como antígenos no deseables encontrados en la superficie de células cancerosas). Esto permite la construcción de composiciones inmunogénicas que incluyen, pero no se limitan a, vacunas que tienen amplia aplicabilidad, ya que una composición individual se puede utilizar para provocar una respuesta inmune a múltiples patógenos. Por ejemplo, se puede obtener una composición inmunogénica que proporcione una respuesta inmunológica protectora frente a una amplia escala de lisavirus, mientras que al mismo tiempo proporciona una respuesta protectora frente a otros virus, tales como polio e influenza. Dicha composición inmunogénica multivalente se proporciona por la naturaleza quimérica de los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención, así como la presencia del sitio III de un lisavirus, el cual confiere una fuerte respuesta inmunogénica a los epítomos del polipéptido antigénico.

La composición inmunogénica de la invención provoca una respuesta inmunogénica en individuos a quienes se administra. La respuesta inmunogénica puede provocar una respuesta inmune protectora, pero dicha respuesta no es necesaria. Las respuestas inmunogénicas se pueden potenciar, o de otra forma modificar, por la inclusión de componentes, además de los ácidos nucleicos quiméricos, proteínas quiméricas y moléculas portadoras de la invención. De manera alternativa, las composiciones inmunogénicas pueden constar esencialmente de los ácidos nucleicos quiméricos, proteínas quiméricas y moléculas portadoras de la invención.

La invención describe un método para obtener una composición inmunogénica. En una realización, el método comprende aislar y/o purificar el ácido nucleico o polipéptido quimérico o la molécula portadora. En otra realización, el método comprende aislar el ácido nucleico o polipéptido o la molécula portadora, luego combinarlo con componentes adicionales. Los componentes adicionales pueden ser cualquier compuesto adecuado que no tenga un efecto adverso en la inmunogenicidad, seguridad o efectividad del ácido nucleico, polipéptido o molécula portadora de la invención. Los componentes adicionales incluyen pero no se limitan a compuestos y aditivos que se añaden típicamente a composiciones inmunogénicas para aumentar la inmunogenicidad, estabilidad y biodisponibilidad. Dichos aditivos se describen anteriormente, y son conocidos por los expertos en la técnica.

En otra realización, el método para obtener una composición inmunogénica es un método para expresar un polipéptido (híbrido) quimérico para uso en la producción de una composición inmunogénica. En esta realización, el ácido nucleico quimérico de la molécula portadora de la invención se expresa (transcribe y traduce) de modo que se produce el polipéptido quimérico. El polipéptido quimérico así producido es entonces aislado y/o purificado hasta un nivel aceptable, de modo que se puede utilizar para obtener una composición inmunogénica. Como se utiliza en la presente, un polipéptido es un polímero de aminoácidos, e incluye péptidos (más de 3 aminoácidos de longitud), y proteínas (más de 100 aminoácidos de longitud). La producción del polipéptido quimérico se puede realizar *in vivo* o *in vitro*. Preferiblemente, la producción ocurre *in vivo* mediante expresión en cultivos bacterianos o de tejido, y el polipéptido quimérico se aísla de esos cultivos utilizando técnicas conocidas de purificación de proteínas.

También se describen métodos para obtener las moléculas portadoras y los polipéptidos quiméricos de la invención. Los métodos incluyen técnicas comúnmente conocidas de manipulación genética, que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Se puede utilizar cualquier técnica conocida, que sea practicada de manera normal por el experto en la técnica, para producir y purificar las moléculas quiméricas de la molécula portadora de la invención. La novedad de la invención no reside en estas técnicas, sino en las moléculas quiméricas construidas a través del uso de las mismas. En este aspecto, los métodos se pueden utilizar para obtener un ácido nucleico o molécula portadora para uso en la producción de una composición inmunogénica, tal como una vacuna de ADN.

La invención también describe métodos para tratar a individuos con las composiciones inmunogénicas de la invención. Preferiblemente, el método es un método de vacunación. El método comprende administrar las composiciones inmunogénicas a individuos, o pacientes, en necesidad de tratamiento, que se considera que necesitan tratamiento, o que desean tratamiento profiláctico (protector) para una enfermedad o trastorno. Se puede utilizar cualquier método conocido de administración en este aspecto de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, inyección con jeringa y aguja (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa), administración oral o en mucosas, inhalación, administración tópica (por ejemplo, aplicación directa a la piel), y mediante supositorio.

## ES 2 267 510 T3

También se describe un método comprende administrar los ácidos nucleicos quiméricos de la molécula portadora de la invención a un individuo, en una cantidad suficiente para provocar una reacción inmunogénica en el receptor. Preferiblemente, esta respuesta es una respuesta protectora. La cantidad de ácido nucleico necesaria para dicha inmunización se puede determinar por los expertos en la técnica sin experimentación indebida o excesiva. Por ejemplo, se pueden administrar composiciones que comprendan los ácidos nucleicos quiméricos y moléculas portadoras de la invención en una cantidad de 40 a 100  $\mu\text{g}$ , intramuscularmente, en una o varias inyecciones. Una dosis de 100  $\mu\text{g}$  es generalmente útil para perros, y una dosis de 40  $\mu\text{g}$  para ratones (con peso de 20 g).

También se describe un método comprende administrar los polipéptidos quiméricos de la invención a un individuo. Preferiblemente, la respuesta es una respuesta protectora. La cantidad de polipéptido necesaria para dicha inmunización se puede determinar por los expertos en la técnica sin experimentación indebida o excesiva. Por ejemplo, se pueden administrar composiciones que comprendan los polipéptidos quiméricos de la invención en una cantidad de 1 a 10  $\mu\text{g}$ , intramuscularmente, en una o varias inyecciones.

También se describe un método comprende administrar la molécula portadora de la invención a un individuo. Preferiblemente, la respuesta es una respuesta protectora. La cantidad de molécula portadora necesaria para dicha inmunización la puede determinar el experto en la técnica sin experimentación indebida o excesiva. Por ejemplo, se pueden administrar composiciones que comprendan las moléculas portadoras de la invención en una cantidad de 40 a 100  $\mu\text{g}$ , intramuscularmente, en una o varias inyecciones.

También se describe un método que incluye además administrar cualquier combinación de los ácidos nucleicos quiméricos, los polipéptidos quiméricos y la molécula portadora de la invención, a un individuo. El individuo puede ser un animal, y de preferencia es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero se selecciona del grupo que consta de un ser humano, un perro, un gato, un bóvido, un cerdo y un caballo. En una realización especialmente preferida, el mamífero es un ser humano.

También se describen métodos de tratamiento que incluyen administrar composiciones inmunogénicas que comprendan polipéptidos, pero también composiciones que comprendan ácido nucleicos (incluyendo la molécula portadora). Los expertos en la técnica son conscientes del concepto, aplicación y efectividad de vacunas de ácidos nucleicos (por ejemplo, vacunas de ADN) y las tecnologías de las vacunas de ácidos nucleicos, así como de las tecnologías a base de polipéptidos y proteínas. La tecnología a base de ácidos nucleicos permite la administración de ácidos nucleicos, desnudos o encapsulados, directamente a tejidos y células, sin la necesidad de producir proteínas codificadas antes de la administración. La tecnología se basa en la capacidad de estos ácidos nucleicos para ser captados por células del organismo receptor y expresados para producir un determinante inmunogénico al cual responde el sistema inmune del receptor. Normalmente, los antígenos expresados se despliegan en la superficie celular de células que han captado y expresado los ácidos nucleicos, pero los antígenos codificados se pueden expresar y exportar al sistema circulatorio del individuo receptor. Dicha tecnología de vacunas de ácidos nucleicos incluye, pero no se limita a, el suministro de ARN y ADN desnudo, y el suministro de vectores de expresión que codifican polipéptidos de interés (moléculas portadoras). Aunque la tecnología se denomina "vacuna", es igualmente aplicable a composiciones inmunogénicas que no dan como resultado una respuesta protectora.

La presente invención también describe el suministro de ácidos nucleicos como parte de composiciones más grandes o más complejas. Entre estos sistemas de suministro se incluyen virus, partículas similares a virus, o bacterias que contienen el ácido nucleico quimérico o molécula portadora de la invención. También se incluyen dentro del alcance de la invención los ácidos nucleicos y moléculas portadoras de los complejos de la invención con compuestos permeabilizantes de células, tales como liposomas. Otros compuestos, vectores supramoleculares (documento EP 696.191, Samain *et al.*) y sistemas de suministro para vacunas de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la técnica, y se ejemplifican en los documentos WO 90 111092 y WO 93 06223 (patentes de Vical), y se pueden obtener y utilizar sin experimentación indebida o excesiva.

Los métodos para tratar individuos incluyen tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico y tratamiento curativo. El tratamiento profiláctico es el tratamiento de un individuo, utilizando los métodos de la invención, antes de que se identifique cualquier signo clínico de enfermedad o infección. De esta forma, el tratamiento profiláctico es un tratamiento preventivo, e incluye vacunación. El tratamiento profiláctico también incluye el tratamiento que es instituido después del comienzo de la enfermedad o infección real, pero antes de que se observe otro signo clínico de la enfermedad o infección. El tratamiento terapéutico es el tratamiento de un individuo después de que se identifica por lo menos un signo clínico de enfermedad o infección, o después de que se sabe (o que se sospecha en gran medida) que un individuo ha sido expuesto a una cantidad de un agente suficiente para ocasionar enfermedad o infección. Los métodos de tratamiento terapéutico no necesariamente dan como resultado la eliminación de la enfermedad o infección; sin embargo, proporcionan una mejora clínicamente detectable en por lo menos un signo clínico de la enfermedad o infección. Los métodos de tratamiento curativo dan como resultado la eliminación completa de los signos clínicos de la enfermedad o infección en el individuo tratado. Se incluye en los métodos de tratamiento curativo aquellos que dan como resultado la eliminación completa del agente causante de la infección o enfermedad, ya sea éste un virus, bacteria, o célula hospedante (tal como una célula cancerosa). También se incluye en los métodos de tratamiento curativo aquellos que ocasionan remisión completa de una enfermedad, es decir, la eliminación completa de cualquier signo clínico externo de infección o enfermedad, y la represión de todas las manifestaciones clínicas detectables de la infección o enfermedad.

## ES 2 267 510 T3

Con respecto a vacunación de la rabia, se sabe que el virus puede ser tratado tanto profilácticamente (por ejemplo, mediante vacunación de perros) como curativamente (por ejemplo, mediante una serie de inyecciones a un ser humano previamente mordido por un perro rabioso). De esta forma, también se describe un método de vacunación de un individuo con una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención. Como se discutió anteriormente, se describe que la composición inmunogénica de la invención puede comprender (o codificar) múltiples determinantes antigénicos. Por lo tanto, el método de tratamiento descrito puede incluir múltiples tipos de tratamiento para múltiples tipos de enfermedades o infecciones. Por ejemplo, un método individual de tratamiento puede comprender tratamiento profiláctico de la polio, tratamiento profiláctico y terapéutico de la rabia, y tratamiento profiláctico de la gripe.

Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden hacer diferentes modificaciones y variaciones en la construcción de las moléculas de la invención sin apartarse del alcance o espíritu de la misma. Ahora, la invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos específicos de la invención.

### Breve descripción de los dibujos y tablas

La invención se describirá con más detalle con referencia a los dibujos, en los cuales:

La figura 1 representa glicoproteínas de lisavirus y construcciones quiméricas de glicoproteínas de lisavirus. SP - péptido señal; TM - dominio transmembránico; S1 - restos de aminoácidos NL; S2 - restos de aminoácidos NS; S3 - restos de aminoácidos LFAV.

(A) Representación esquemática de glicoproteína (G) de PV de lisavirus, que indica regiones que abarcan el sitio II, el sitio III y los epítomos I, V y VI, así como también se presenta en la parte superior el dominio transmembránico (TM). Los polipéptidos quiméricos están ilustrados esquemáticamente en las otras líneas, con puntos de supresión y/o fusión indicados por números de restos. Los números son las posiciones de los restos de aminoácidos en la proteína madura (péptido señal escindido).

(B) Secuencias de aminoácidos de los polipéptidos quiméricos en los sitios de fusión. La región lineal que porta el epítomo VI (aminoácido 264) se indica subrayando en los restos 251-275. Los cuadros negros y grises señalan las secuencias de EBL-1 y Mok, respectivamente. Las líneas punteadas representan aminoácidos similares a los de la secuencia de PV, y los puntos corresponden a espacios.

(C) Representación esquemática de las secuencias insertadas que codifican el epítomo de poliovirus C3 involucrado en la inducción de anticuerpos neutralizantes del virus (B), y el epítomo de células CD8 H-2d (CTL) de la nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) involucrado en la inducción tanto de linfocitos T citotóxicos (CTL) como en la protección contra la exposición a LCMV en la glicoproteína G de lisavirus truncada (GPVIII) y quimérica (GEBL1-PV).

(D) También se da el análisis de la secuencia PEST putativa alrededor de la unión del extremo de la parte EBL1 y el comienzo del epítomo de células B.

(E) Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de proteínas G de lisavirus seleccionados. La secuencia de consenso se presenta como la secuencia inferior. Los cuadros en gris claro indican los principales sitios antigénicos. Los cuadros en gris oscuro indican el péptido señal hidrófobo (SP) y el dominio transmembránico (TM). Los motivos subrayados NX(S/T) son sitios potenciales de N-glicosilación.

La figura 2 muestra microscopía de inmunofluorescencia indirecta de la producción de G de lisavirus en células Neuro-2a 48 horas después de la transfección transitoria con diversos plásmidos: pGPV-PV (A, B y C), pG-PVIII (D, E y F), pGEBL1-PV (G, H e I), pGMok-PV (J, K y L), y pGPV-Mok (M, N y O). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se permeabilizaron y tiñeron con anticuerpos: PAb anti-G del PV (A, D, G, J y M), MAb anti-sitio III de la G nativa del PV de PV D1 (B, E, H y K), MAb anti-sitio III de la G desnaturalizada de 6B1 (C y F), PAb anti-G de EBL-1 (I), PAb anti-G de Mok (L y N) y suero de un ratón no inmunizado (O).

La figura 3 muestra los resultados de un estudio cinético de síntesis de antígeno en células Neuro-2a transfectadas transitoriamente con pGPV-PV (a), pGEBL1-PV (b) o pG-PVIII (c). Las células se permeabilizaron a diferentes tiempos, y se tiñeron con PAb de PV (barra punteada) o MAb anti-sitio III de la G desnaturalizada de 6B1 (barra sombreada).

La figura 4 muestra los resultados de la inducción de células productoras de IL-2 mediante plásmidos que codifican diferentes G de lisavirus. Se inyectaron intramuscularmente ratones BALB/c (dos animales por cada uno de los plásmidos) (50  $\mu$ l en cada músculo tibial anterior) con 40  $\mu$ g de plásmido (pGPV-PV, pG-PVIII, pGEBL1-PV, pGMok-PV y pGPV-Mok). Se retiraron los bazos 21 días después, y los esplenocitos se estimularon específicamente *in vitro* mediante virus inactivados y purificados (PV, EBL1 o Mok), G PV, o se estimularon policlonalmente mediante conavalina A (ConA). Luego, la cantidad de IL-2 liberada se analizó por triplicado mediante bioensayo, y los títulos se expresaron como U/ml.

La figura 5 muestra la inducción de VNAb contra genotipos de lisavirus Europeo mediante plásmido. Se inyectaron a ratones BALB/c con 40  $\mu$ g de plásmido en el músculo tibial.

## ES 2 267 510 T3

(A) Inyección con pGPV-PV. Los ratones recibieron una revacunación en el día 30. Los sueros (conjunto de tres muestras) se analizaron en los días 27 y 40 para determinar VNAb contra virus de genotipos 1 (CVS y PV), 5 (EBL1b) y 6 (EBL2b).

5 (B) Inyección con pGEBL1-PV. Cuatro ratones recibieron solamente una inyección de plásmido, y se recogieron muestras de sangre en diferentes intervalos mediante perforación transorbital. Los sueros se analizaron mediante RFFIT utilizando virus de PV y EBL1b para determinación de VNAb.

10 La figura 6 muestra protección comparativa inducida por plásmidos pGPV-PV, pGEBL1-PV y vacunas de PM y PV de la rabia, contra CVS, EBL-1b, y EBL-2b. Se inyectaron a ratones BALB/c (9 animales por serie) intraperitonealmente en los días 0 y 7 con 0,5 ml de vacuna de PM diluida 1/10<sup>o</sup> (círculos negros), o con 2 µg de virus de PV inactivado y purificado (cuadros negros). Para las inmunizaciones a base de ADN, se inyectaron a ratones BALB/c (5 animales por cada plásmido) en el músculo tibial con PBS (círculos en blanco) o con 40 µg de diferentes plásmidos pGPV-PV (rombo), EBL1-PV (triángulo negro), cadena plasmídica de pCIneo (cruz). Se inyectaron a ratones Suizos (6 animales) con pGPV-PV (cuadro blanco).

(a) se inyectó virus inactivado. Los ratones BALB/c y Suizos se expusieron i.c. en el día 21 con aproximadamente 30 LD<sub>50</sub> de CVS.

20 (b) se inyectó virus inactivado. Los ratones BALB/c y Suizos se expusieron i.c. en el día 21 con aproximadamente 30 LD<sub>50</sub> de EBL-1b.

(c) se inyectó virus inactivado. Los ratones BALB/c y Suizos se expusieron i.c. en el día 21 con aproximadamente 30 LD<sub>50</sub> de EBL-2b.

25 (d) se inyectó ADN. Los ratones BALB/c y Suizos se expusieron i.c. en el día 21 con aproximadamente 30 LD<sub>50</sub> de CVS.

(e) d) se inyectó ADN. Los ratones BALB/c y Suizos se expusieron i.c. en el día 21 con aproximadamente 30 LD<sub>50</sub> de EBL-1b.

30 (f) d) se inyectó ADN. Los ratones BALB/c y Suizos se expusieron i.c. en el día 21 con aproximadamente 30 LD<sub>50</sub> de EBL-2b.

35 La figura 7 muestra la microscopia de inmunofluorescencia indirecta de antígenos expresados en células Neuro-2a transfectadas con plásmidos.

(A) las células se transfectaron con plásmido pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV, y se tiñeron con D1 MAb de la rabia.

40 (B) las células se transfectaron con plásmido pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV, y se tiñeron con C3 MAb de poliovirus.

(C) las células se transfectaron con plásmido pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV, y se tiñeron con el PAb antipoliovirus tipo 1.

45 (D) las células se transfectaron con plásmido pCIneo, y se tiñeron con 1) D1 MAb de la rabia, 2) C3 MAb de poliovirus, o 3) PAb antipoliovirus tipo 1.

50 La figura 8 muestra la inducción de células productoras de IL2 mediante pGPVIII (A) o pGEBL1-PV (B) que portan epítomos de poliovirus y de LCMV. Se inyectaron a ratones BALB/c (dos animales para cada plásmido) i.m. (50 µg en cada músculo tibial anterior) con plásmidos. Se retiraron los bazo 14 días después, y los esplenocitos se estimularon *in vitro* a través de medio de cultivo celular (barra cruzada) específicamente mediante lisavirus inactivados y purificados (IPLV PV: barra fragmentada; IPLV EBL: sombras claras), o se estimularon policlonalmente mediante ConA (barra punteada). La cantidad de IL-2 liberada se analizó luego por triplicado mediante bioensayo, y los títulos se expresaron como U/ml.

55 (A) Los plásmidos inyectados fueron plásmidos vacíos de pCIneo, pGPVIII, y p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII.

(B) Los plásmidos inyectados fueron pCIneo, pGEBL1-PV, pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL)-PV, pGEBL1-(CTL-B)-PV, pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV.

60 La figura 9 muestra un estudio cinético en ratones BALB/c de producción de anticuerpos inducida por p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII o pGPVIII contra péptido de poliovirus y virus de rabia. Se inyectaron a tres ratones con 40 µg de p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII (cuadro y círculo), o pGPVIII (triángulo), o pCIneo vacío (rombo). Después de perforación mediante vía retroorbital en diferentes tiempos, los sueros se analizaron mediante ELISA para determinar los anticuerpos contra péptido de poliovirus (cuadro y rombo) o el virus de rabia (círculo, triángulo y rombo).

65 La figura 10 muestra la influencia de un cebado en la producción de anticuerpos antipéptidos de poliovirus, inducida por p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII. Cinco grupos de tres ratones recibieron en el día 0 PBS (2 grupos), p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII (2

## ES 2 267 510 T3

grupos), o pPVIII. Un grupo (inyectado con p(B-CTL)2-GPVIII) no se revacunó, mientras que el grupo inyectado con pPVIII se revacunó con p(B-CTL)2-GPVIII en el día 26. Un grupo (inyectado con p(B-CTL)2-GPVIII) se revacunó con p(B-CTL)2-GPVIII en el día 14. Todos los animales se controlaron en el día 39, mediante ELISA, para determinar la producción de anticuerpos antipeptídicos.

La figura 11 muestra la producción de anticuerpos neutralizantes del virus de rabia contra la cepa original del virus Challenge (CVS) después de la inyección del plásmido homogéneo completo pGPV en perros sabueso.

Grupo A: inyección de 100  $\mu$ g de plásmido en un sitio en los días 0, 21, 42 y 175.

Grupo B: inyección de 33  $\mu$ g de plásmido en tres sitios en los días 0, 21, 42 y 175.

Grupo C: inyección de 100  $\mu$ g de plásmido en un sitio en los días 0 y 175.

Grupo D: inyección de disolución salina tamponada de fosfato (control).

La figura 12 muestra la respuesta de anticuerpos neutralizantes individuales contra un virus de rabia silvestre (zorro de Francia, virus de rabia silvestre del zorro FWR) después de inyección del plásmido homogéneo completo pGPV en perros sabueso. También se muestra la protección inducida contra una exposición intramuscular realizada en el día 175 con un virus de rabia silvestre aislado de perros rabiosos.

Perros nos. 1 a 3 = grupo A

Perros nos. 4 a 6 = grupo B

Perros nos. 7 a 9 = grupo C

Perros nos. 10 a 12 = grupo D

La figura 13 muestra células N2A transfectadas con el plásmido DBL-3/PVHIII (Fugene, Roche Molecular Biochemicals) y fijadas con acetona (80%) durante 10 minutos en hielo. A) anti proteína de fusión DBL-3 GST de ratón (dilución 1/1000). B) Anti PVIII de conejo (dilución 1/400). Se muestran las reactividades de fondo vistas con el segundo anticuerpo conjugado a FITC. Esta figura muestra claramente que tanto las regiones DBL-3 como PVIII se expresaron de manera eficiente en la membrana de las células transfectadas.

### Ejemplos

Para los ejemplos, se utilizaron los siguientes materiales y métodos, excepto que se especifique de otro modo.

Se adquirieron ratones BALB/c hembras (H-2<sup>d</sup> BALB/c), de 6 a 8 semanas, y ratones Suizos (14 a 16 g) de "Centre d'Élevage et de Recherche" Enero (Legenest St Isle, Francia).

**Células y lisavirus.** Las células BHK-21 utilizadas para la producción y titulación de lisavirus se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) de Eagle que contiene suero fetal bovino al 5% (FBS) y suero de becerro recién nacido al 5% (Perrin, P., 1996, "Techniques for the preparation of rabies conjugates", en *Laboratory techniques in rabies*, Meslin, F-X., Kaplan, M., y Koprowski, H. Eds., (WHO Ginebra): 433-445). Las células de neuroblastoma (Neuro-2a) utilizadas para estudios de transfección con plásmidos se cultivaron en MEM que contiene FBS al 8%.

La línea celular T citotóxica dependiente de interleuquina-2 (IL-2) (CTLL) se cultivó como se describe anteriormente (Perrin, P. *et al.*, 1988, "Interleukin-2 increases protection against experimental rabies", *Immunobiol.* **177**:199-209) en medio RPMI-1640 (Gibco: Flowbio, Courbevoie, Francia) que contiene FBS al 10%, 1 mM de piruvato de sodio, 1 mM de aminoácidos no esenciales,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoetanol, tampón HEPES (Flow Laboratories, Bethesda, USA), y 5 a 10 unidades (para  $1 \times 10^4$  células) de IL-2 de rata (sobrenadante de esplenocitos estimulado con concanavilina A: Con A). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 7,5% CO<sub>2</sub>.

Se multiplicaron (se hicieron pasar) cepas de la rabia de virus fijo PV-Paris/BHK-21, CVS, así como cepas de virus relacionados con la rabia (EBL1b, EBL2b, LCMV, y Mok), en células BHK-21 como se describe anteriormente por Perrin, P., 1996, *más arriba*. Los lisavirus de murciélago Europeo utilizados fueron EBL1b (número de cepa 8916FRA), derivados de un aislado de murciélago de Francia, y EBL2b (número de cepa 9007FIN, un obsequio de H. Bouhry), aislado de un ser humano en Finlandia (Amengal, B. *et al.*, 1997, "Evolution of European bat lissaviruses", *J. Gen. Virol.* **78**:2319-2328). La cepa Arm/53b de LCMV fue provista amablemente por Drs. M. Oldstone y M. McChesney (Scripps Clinic, La Jolla, CA).

**Antígenos y vacunas del virus de rabia.** Los lisavirus inactivados y purificados (IPRV) se prepararon como se describe por Perrin, P., 1996, *más arriba*. Los virus se purificaron a partir de sobrenadantes de células infectadas inactivadas ( $\beta$ -propiolactona) y clarificadas, mediante ultracentrifugación a través de un gradiente de sacarosa. La glicoproteína de PV se solubilizó a partir de IPRV, y se purificó (G PV) como se describe anteriormente por Perrin, P., 1996, *más arriba*, y Perrin, P., *et al.*, 1985, "Rabies immunosomes (subunit vaccine) structure and immunogenicity", *Vaccine*, **3**:325-332.

## ES 2 267 510 T3

Los dos virus de la rabia inactivados utilizados para estudios de protección comparativos se prepararon con dos cepas diferentes: 1) PM como vacuna comercial para uso humano; (Pasteur Vaccins Mames-la Coquette Francia; Lote Y0047); 2) PV como vacuna para uso en laboratorio (IPRV).

5 *Construcción de plásmidos que expresan genes de G de lisavirus.* Se seleccionó la región (aminoácidos 253-275) que solapa el único epítipo no conformacional (VI) (Figura 1) para la construcción de genes quiméricos, debido a que supuestamente está estructuralmente menos limitada que los dos sitios II y III antigénicos principales. Los genes de G de lisavirus homógenos y quiméricos (véase la figura 1) se introdujeron en el vector de expresión eucariótico pCneo (Promega), se propagaron y se amplificaron en cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* mediante protocolos de clonación molecular  
10 estándares, bien conocidos por el experto en la técnica. Los plásmidos pGPV-PV y pGMok-PV se prepararon como se describe anteriormente (Bahloul, C., *et al.*, 1998, "DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses", *Vaccine* **16**:417-425). Los plásmidos pGPV-Mok, pG-PVIII y pGEBL1-PV se obtuvieron de la siguiente manera.

15 Para pGPV-Mok, la secuencia codificante de la parte del sitio II de G PV (aminoácidos 1-257) se amplificó mediante RT-PCR utilizando cebadores degenerados:

PVXbaI: (SEQ ID NO.: 1)

20 PVBcI: (SEQ ID NO.:2)

El producto de PCR se insertó en el sitio SmaI de pUC19, después se cortó con *BcI* y *EcoRI*, y se ligó entre los mismos sitios en pGMok-Mok, dando pGPV-Mok, que contiene una fusión en marco de aminoácidos 1-257 de G PV con aminoácidos 258-503 de G Mok.

25 El gen de pG-PVIII, con una supresión en marco interno entre el extremo del péptido señal de PV y el resto 253, se obtuvo introduciendo un adaptador sintético entre los sitios de restricción *EcoRI* y *BcI* del plásmido pGMok-PV. Este adaptador de PV, que contiene un solo sitio *EcoRI*, se generó hibridando 200 picomoles de cada cebador en 250 mM de Tris-HCl pH 7,7. El plásmido pG-PVIII se depositó el 22 de diciembre de 1998 en el Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Paris, Francia, y se le dio el número de acceso I-2115.

30 PVp1: (SEQ ID NO.: 3)

Pvp2: (SEQ ID NO.4)

35 Para generar el gen de pGEBL1-PV, se generó un adaptador sintético que corresponde a los aminoácidos 2-14 de EBL-1a (cepa 8615POL) (1) y sitios de restricción *BstEII* y *EcoRI* individuales, de la misma manera que aquella para pG-PVIII, mediante hibridación con:

40 EBL1p1: (SEQ ID NO.: 5)

EBL1p2: (SEQ ID NO.: 6)

Este adaptador de EBL1 se ligó en marco en el sitio *EcoRI* de pG-PVIII. Se generó entonces un fragmento que  
45 corresponde a los aminoácidos 15-253 de EBL-1a (cepa 8615POL), mediante RT-PCR de ARN viral, utilizando cebadores EBL1 p3 y EBL1 p4:

EBL1p3: (SEQ ID NO.: 7)

50 EBL1p4: (SEQ ID NO.: 8)

El producto de RT/PCR se digirió con *BstEII* y *EcoRI*, y se ligó en los mismos sitios introducidos mediante el adaptador de EBL1, dando como resultado una fusión en marco entre el péptido señal de PV, la parte EBL1a del sitio II y la parte del sitio III de PV. La identidad de cada constructo se confirmó mediante secuenciación automática con  
55 reacción de terminador con colorante sobre un secuenciador ABI 377 (Perkin-Elmer). El pEBL1-PV se depositó en el CNCM el 22 de diciembre de 1998, y se le asignó el número de acceso 1-2114.

60 *Inserción de epítipos de células B y CD8 extrañas en genes de G truncados o quiméricos.* Los genes truncado (pGPVIII) y quimérico (pGEBL1-PV), dados a conocer anteriormente, que contienen un sitio de clonación *EcoRI* único, se utilizaron para la inserción de epítipos de células B y CD8 extrañas. Los genes de G de lisavirus se introdujeron en el vector de expresión eucariótico pCneo (Promega), se propagaron y se amplificaron en cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* mediante protocolos estándares de clonación molecular.

Los epítipos de las células B y CD8 se insertaron en el sitio de restricción *EcoRI* de los genes de G de lisavirus truncados o quiméricos, en la región de bisagra (aminoácidos 253 a 275) de la molécula en la posición 253. El epítipo de células B (denominado \*B+) correspondió al fragmento C3 (aminoácidos 93 a 103: DNPASTTNKDK: SEQ ID NO: 9) de la proteína del poliovirus VP1. El epítipo de células CD8 (denominado \*CTL+) correspondió a los aminoácidos 119-127 (PQASGVYMG: SEQ ID NO:10) o a los aminoácidos 117-132 (ERPQASGVYMGNLTAQ: SEQ ID NO:11)

## ES 2 267 510 T3

de la nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica. Los plásmidos p(B-CTL)2-GPVIII, pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL)-PV, pGEBL1-(B-CTL)-PV, pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV, y pGEBL1-(CTL-B)-PV se obtuvieron de la siguiente manera (véase también la figura 1):

5 El gen de P(B-CTL)2-GPVIII se generó mediante clonación de dos etapas de un adaptador sintético en el sitio de restricción *EcoRI* único, hibridando 200 picomoles de cada uno de los cebadores:

\*B-CTLP1+: (SEQ ID NO:12)

10 \*B-CTLP2+: (SEQ ID NO:13)

Para pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL)-PV, los adaptadores sintéticos utilizados para la inserción fueron respectivamente:

15 B: Bp3+: (SEQ ID NO: 14)

\*Bp4+: (SEQ ID NO: 15)

20 CTL: CTLP5+: (SEQ ID NO: 16)

\*CTLP6+: (SEQ ID NO:17).

Para la construcción de los plásmidos pGEBL1-(B-CTL)-PV y pGEBL1-(CTL-B)-PV, se utilizaron pGEBL1-(B)-PV y pGEBL1-(CTL)-PV en las mismas condiciones como anteriormente para insertar las secuencias de CTL y B, respectivamente, en los genes quiméricos.

La identidad de cada constructo se confirmó mediante secuenciación automática con reacción de terminador con colorante en un secuenciador ABI 377 (Perkin-Elmer).

30 *Experimentos de expresión transitoria.* La capacidad de los plásmidos para inducir la expresión transitoria de antígenos relacionados con G se estudió después de la transfección de células Neuro 2a utilizando el método mediado por liposomas catiónicos DOTAP, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). Cada pocillo de una microplaca de cultivo celular (Falcon) se inoculó con  $3 \times 10^4$  células (en MEM, 10% FBS), y se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 7,5% de CO<sub>2</sub>. La placa se lavó entonces con MEM sin FBS, y se incubó como antes durante 1 hora. El sobrenadante celular se eliminó, y los pocillos se lavaron y se llenaron con un volumen total de 50  $\mu$ l de disolución de transfección, la cual contiene 0,1  $\mu$ g de plásmido y 6  $\mu$ l de DOTAP (metilsulfato de (N-(1-2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio) en disolución salina estéril tamponada con HEPES (150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES) incubada previamente a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las placas se incubaron durante 5 horas a 37°C en presencia de 7,5% de CO<sub>2</sub>. Se añadieron a cada pocillo 200  $\mu$ l de MEM que contiene FBS al 2%, y la placa se incubó durante 24 a 140 horas en las mismas condiciones, antes del análisis de la expresión transitoria mediante inmunofluorescencia indirecta.

La capacidad de los plásmidos para inducir la expresión transitoria de G y antígenos extraños relacionados se estudió después de la transfección de células Neuro 2a utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). Cada pocillo de una cámara Labtek de cultivo celular Nunc (Life Technologies) se inoculó con  $3 \times 10^4$  células (en MEM, 10% FBS), y se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 7,5% de CO<sub>2</sub>. Las placas se lavaron entonces con MEM sin FBS, y los pocillos se llenaron con 50  $\mu$ l de disolución de transfección: 0,1  $\mu$ g de plásmido, 3  $\mu$ l de reactivo de transfección FuGENE 6, y 47  $\mu$ l de medio. La placa se incubó durante 18 horas a 37°C en presencia de 7,5% de CO<sub>2</sub>. Se añadieron a cada pocillo 200  $\mu$ l de MEM que contiene 5% FBS, y la placa se incubó otras 24 horas en las mismas condiciones, antes del análisis de la expresión transitoria mediante inmunofluorescencia indirecta.

55 *Anticuerpos.* Los anticuerpos policlonales (PAb) dirigidos contra PV y Mok G se obtuvieron como se describe por Perrin, P., 1996, "Techniques for the preparation of rabies conjugates", en *Laboratory techniques in rabies*, Meslin, F-X., Kaplan, M., y Koprowski, H., Eds. (WHO Ginebra):433-445, mediante inmunización de conejo con glicoproteína de virus purificado. El PAb contra el virus EBL-1b se obtuvo mediante inmunización de ratón con virus inactivado y purificado.

También se utilizaron tres anticuerpos monoclonales (MAb) dirigidos contra PV G. El PVE12 MAb (un MAb desarrollado por M. Lafon *et al.*, 1985 "Use of a monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccines glycoprotein by enzyme immunoassay", *J. Biol. Standard* **13**:295-301) reconoce el sitio II de G nativa. El D1 MAb (isotipo IgG 1), producido en nuestro laboratorio, reconoce el sitio III de G nativa, pero no de G tratada con SDS. El 6A1 MAb (un MAb reportado en 18 de 2) reconoce la proteína G desnaturalizada con SDS, y más precisamente dos péptidos localizados en dirección 3' del sitio III, cerca de la parte COOH terminal del ectodominio de G (aminoácidos 342-433 y 397-450).

*Microscopía de inmunofluorescencia.* La expresión transitoria de antígenos de G en células transfectadas se calculó con y sin permeabilización (30 minutos de incubación con acetona al 80% sobre hielo, seguido del secado por aire). Las

células transfectadas se incubaron durante 1 hora a 37°C con PAb o MAb. Se lavaron con PBS, y se incubaron durante 1 hora a 37°C con anticuerpo secundario conjugado con anti-FITC de conejo o de ratón (Nordic Immunol. Labs, Países Bajos). Las células se lavaron, se montaron en glicerol, y se examinaron en un microscopio de fluorescencia invertida Leica.

Dos anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra PV G (D1 MAb isotipo IgG 1) y poliovirus (C3 MAb) se utilizaron para tinción de antígeno mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF). D1 MAb reconoce el sitio III de G nativa pero no de G tratada con SDS, y C3 MAb reconoce la región 93-103 de la proteína VP1 de cápsida de PV-1. También se utilizó un anticuerpo policlonal neutralizante de conejo, dirigido contra el poliovirus tipo 1 nativo.

La expresión transitoria se evaluó después de la fijación de paraformaldehído al 3% (Sigma) (20 minutos de incubación a temperatura ambiente) sin permeabilización. Las células fijas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con MAb. Se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con anti-FITC de ratón o de conejo de cabra (Nordic Immunol. Labs, Países Bajos). Las células se lavaron, se montaron en Mowiol (Sigma) y se examinaron en un microscopio de fluorescencia invertida Leica.

*Análisis de secuencia PEST putativa.* Las secuencias PEST polipeptídicas, implicadas potencialmente en la degradación rápida de proteína, se analizaron con el programa de ordenador de búsqueda PEST desarrollado de acuerdo con Rogers, *et al.*, 1986, "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hipótesis", *Science* **234**: 364-369.

*Inyección de plásmidos en ratones.* Para estudios inmunológicos, se anestesiaron ratones BALB/c con pentobarbital (30 mg/kg) y se inyectaron 20-50 µg de plásmido (diluido en PBS) en cada músculo tibial anterior. Esto fue más efectivo que la inyección a través de la ruta de cuádriceps (observación personal). Se recogió sangre para el ensayo de anticuerpo de suero, durante varios días mediante perforación retro-orbital.

Para estudios de protección contra LCMV, los ratones recibieron 3,5 µg de cardiotoxina (Laoxan A.P., Les Ulis, Francia) en cada pata, cuatro días antes de la anestesia y de la inmunización para degenerar el músculo.

*Ensayo de liberación de interleuquina-2.* Catorce días después de la inyección, los bazo se retiraron de los ratones BALB/c sin tratamiento, o de los inyectados con plásmido. Los esplenocitos (alícuotas de 1 ml que contienen  $6 \times 10^6$ ) se estimularon con 0,5 µg de antígeno de lisavirus (por ejemplo, IPLV-PV e IPLV-EBL1) o 5 µg de concanavilina A (Miles), en placas de 24 pocillos (Nuclon-Delta, Nunc), y se cultivaron de acuerdo con procedimientos estándar en medio de RPMI-1640 (Gibco) que contiene 10% FBS, 1 mM de piruvato de sodio, 1 mM de aminoácidos no esenciales,  $5 \times 10^{-6}$  M de 2-mercaptoetanol, 10 mM de tampón HEPES (Flow Laboratories). Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humedecida que contiene 7% de CO<sub>2</sub>. En estas condiciones, las células que producen IL-2 son principalmente células CD4+. La IL-2 producida en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos se tituló mediante bioanálisis utilizando células CTLL como se describe anteriormente por Perrin, P. *et al.*, 1996, "The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses", *Res. Virol.* **147**:289-299. La proliferación celular se determinó por triplicado, basándose en la absorción de <sup>3</sup>H-timidina (New England Nuclear). La concentración de IL-2 se determinó como unidades por ml (U/ml), utilizando IL-2 recombinante de ratón (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) como referencia. Las células CTLL crecieron en presencia de IL-2 de ratón y anticuerpos anti-IL-4, pero no en presencia de IL-4 (hasta 10 U/ml), y en ausencia de IL-2. De esta manera, la IL-2 se detectó de manera predominante mediante esta técnica.

*Ensayos de anticuerpo.* Para el ensayo de anticuerpos de suero, se recogió sangre durante varios días mediante perforación retro-orbital. Se tituló IgG de rabia mediante ensayo inmunoabsorbente enlazado con enzima (ELISA), utilizando microplacas recubiertas con glicoproteína de rabia purificada. El título correspondió a la dilución recíproca de la muestra de suero que da la densidad óptica equivalente al doble de la dada por el suero (diluido 1/20) de ratones inyectados con PBS. Los isotipos totales anti-IgG o IgG1, IgG2a e IgG3 de la rabia se analizaron mediante ELISA utilizando microplacas recubiertas con IPRV como se describe anteriormente por Perrin, P. *et al.*, 1996, "The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus", *J. Biol. Standard.* **14**:95, con sueros de isotipo anti-IgG de ratón de conejo como el anticuerpo secundario (Nordic Immunol. Labs, Países Bajos) y un conjugado de peroxidasa anti-IgG de conejo de cabra (Nordic Immunol. Labs, Países Bajos) como el anticuerpo terciario.

Los anticuerpos neutralizantes de lisavirus se titularon mediante la prueba de inhibición de foco fluorescente rápido (RRFFIT) (descrita por Smith, J. *et al.*, 1996, "A rapid fluorescent focus inhibition test (RRFFIT) for determining virus-neutralizing antibody", en *Laboratory techniques in rabies*, cuarta edición (Eds. Meslin, F-X; Kaplan, M y Koprowski, H) WHO, Ginebra.: 181-189), con las modificaciones descritas anteriormente de Perrin, P. *et al.*, 1986, *J. Biol. Standard.* **14**:95. Se usaron los sobrenadantes de células infectadas (virus PV, CVS y EBL2) y virus purificados (virus Mok y EBL1). Los títulos de anticuerpo anti-PV o CVS se expresan en unidades internacionales por ml (IU/ml), utilizando el Segundo Estándar Internacional (Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca) como referencia. Para la determinación del título del anticuerpo contra otros lisavirus, la dilución de suero que provoca 50% de inhibición de la velocidad de enfoque fluorescente se definió como la que tiene el mismo título de VNAb en cuanto a referencia ensayada contra CVS.

## ES 2 267 510 T3

Los anticuerpos a PV-1 se analizaron mediante ELISA como se describe anteriormente, utilizando microplacas recubiertas con un péptido sintético constituido por un trímero de aminoácidos 93-103 de VP1. También se ensayó mediante ELISA la producción de anti-IgG de LCM.

5 *Ensayo de protección.* La actividad protectora de vacunas y plásmidos se determinó de acuerdo con el ensayo de potencia de NIH. Se inyectaron diluciones de vacuna de manera intraperitoneal (i.p.) en ratones, en los días 0 y 7, mientras que los plásmidos (40  $\mu$ g) se inyectaron en cada músculo tibial anterior, en el día 0 únicamente. Los ratones se expusieron entonces de manera intracerebral (i.c.), en el día 21, a alrededor de 30 LD<sub>50</sub> de diversos lisavirus (CVS, LCMV, EBL1b, o EBL2b). Los animales se observaron durante 28 días o, de manera alternativa, se sacrificaron en el  
10 día 21 después de la exposición, y se recogieron muestras de sangre con el fin de controlar la eliminación de virus y la producción de anti-IgG de LCMV.

### Ejemplo 1

15 *Expresión transitoria de genes G de lisavirus*

Se utilizaron plásmidos que contienen genes de G de lisavirus homogéneos (pGPV-PV), truncados (pG-PVIII), y quiméricos (pGEBL1-PV, pGMok-PV y PGPV-Mok), para transfectar células Neuro 2a. La tinción celular mediante inmunofluorescencia indirecta se da en la figura 2, y se puede resumir de la siguiente manera.

20 Después de la transfección con pGPV-PV, se detectó el antígeno con PV PAb (figura 2A), PV D1 MAb (figura 2B), o PV E12 MaA (no se muestra), principalmente en la membrana celular (resultados similares con células no permeabilizadas, no se muestran los datos), y se detectaron muy pocas con 6A1 MAb (figura 2C). Las células transfectadas con pG-PVIII tuvieron forma redonda, y se tiñeron completamente (tanto el citoplasma como la membrana) con PV PAb (figura 2D) o 6A1 MAb (figura 2F), pero no con PV D1 MAb (figura 2E). Las células transfectadas con pGEBL1-PV se tiñeron principalmente en la membrana celular con PV PAb (figura 2G), PV D1 MAb (figura 2H) o EBL-1 PAb (figura 2I). Las células transfectadas con pGMok-PV se tiñeron (principalmente en la membrana) con PV PAb (figura 2J), PV D1 MAb (figura 2K), Mok PAb (figura 2L), y muy pocas se tiñeron con 6A1 MAb (no se muestra). Las células transfectadas con pGP-Mok se tiñeron con PV PAb (figura 2M) o Mok Pab, y tuvieron forma redonda (figura 2N).  
25 La transfección celular distingue dos tipos de antígenos de G: 1) teñidos principalmente en la membrana de células de forma normal, en particular utilizando MAb neutralizante dirigido contra el sitio II (PV E12) y III (PV D1); y 2) teñidos tanto en el citoplasma como en la membrana de células de forma redonda, en particular utilizando MAb (6A1), que reconoce la molécula de G desnaturalizada.

30 La cinética de la expresión de proteína G se estudió con la transfección de células con tres plásmidos representativos: pGPV-PV (homogéneo), pGEBL1-PV (quimérico) y pG-PVIII (truncado). El pGPV-PV produjo antígenos de G en aproximadamente 60% de células cuando se sometieron a tinción con PV PAb, mientras que muy pocas células se tiñeron con PV 6A1 MAb en cualquier punto de tiempo (figura 3a). Aproximadamente 55% de células transfectadas con pGEBL1-PV se sometieron a tinción con PV Pab, y hasta 15% con 6A1 MAb (figura 3b), indicando que algunas moléculas de G estaban desnaturalizadas. De 10 a 20 por ciento de células transfectadas con pG-PVIII tuvieron forma redonda y se tiñeron con PV Pab, mientras que 5 a 10% fueron positivas con 6A1 MAb, indicando que las moléculas de G estaban desnaturalizadas (figura 3c).

### Ejemplo 2

45 *Inducción de células que producen IL-2*

Se evaluó la capacidad de los plásmidos pGPV-PV, pG-PVIII, pGEBL1-PV, pGMok-PV y pGPV-Mok para inducir células que producen IL-2, y los resultados se muestran en la figura 4. Los plásmidos con la parte del sitio III de PV, ya sea sin fusionar (pG-PVIII) o con cualquier parte del sitio II de lisavirus (pGPV-PV, pGEBL1-PV y pGMok-PV), indujeron de manera eficiente células que producen IL-2 (240 a 550 mU/ml). Esto fue cierto incluso para pG-PVIII, que, sin embargo, tuvo únicamente baja eficiencia tanto para la transfección celular (véase lo anterior) como para la inducción de anticuerpos (véase a continuación). Para los plásmidos quiméricos EBL1-PV y Mok-PV, la respuesta de células T fue mayor después de la estimulación con PV inactivada y purificada que con los virus EBL-1 b o Mok. Este no fue debido a la calidad de los antígenos purificados, porque la inmunización de los ratones BALB/c con virus PV, EBL-1b, o Mok inactivados y purificados, seguido de la estimulación *in vitro* con el mismo antígeno, indujo niveles similares de producción de IL-2 (PV: 250 mU/ml, EBL-1b: 350 mU/ml y Mok: 400 mU/ml). Por el contrario, el plásmido pGPV-Mok indujo únicamente una respuesta celular Th débil (título de IL-2: 50 mU/ml), que fue producida de manera similar *in vitro* después de la estimulación con virus PV o Mok inactivados y purificados.  
60

### Ejemplo 3

*Ensayos serológicos*

65 El plásmido pG-PVIII truncado no indujo la producción de anticuerpos de la rabia, cuando se analizó mediante RFFIT y ELISA. Sin embargo, cuando se inyectó IL-2 junto con pG-PVIII, y después sólo 7 días después, se detectaron mediante ELISA anticuerpos el día 21 únicamente (no se muestran los datos). De este modo, la parte del sitio

III se expresó *in vivo*, e indujo una producción débil de anticuerpos no neutralizantes, la cual se impulsó mediante IL-2 exógena.

Por el contrario, cuando la parte del sitio III de PV se enlazó con la parte del sitio II homóloga, como en pGPV-PV, mostró fuerte inmunogenicidad. Una sola inyección de plásmido pGPV-PV en ratones dio como resultado niveles elevados de VNAb medidos 27 días más tarde, tanto contra el virus PV como CVS homólogos y el virus EBL-2b heterólogo (figura 5a). El isotipo de anticuerpo inducido fue principalmente IgG 2a, pero también se observó una respuesta débil de IgG 1 (no se muestran los datos). Sin embargo, la correlación entre títulos de VNAb contra PV fue más fuerte con IgG 2a ( $r=0,974$ ) que con el título de IgG 1 ( $r=0,71$ ), indicando que el VNAb inducido por inmunización a base de ADN fue principalmente IgG 2a. El título de VNAb contra los virus PV y CVS homólogos aumentó cuando los ratones recibieron una inyección de recuerdo en el día 30 y sus sueros se verificaron en el día 40, pero no los títulos de VNAb contra el virus EBL-2b heterólogo, que permaneció sin cambios (figura 5a). En estas condiciones, también se demostró una relación entre el nivel de VNAb inducido por pGPV-PV y la protección de ratones contra una exposición i.c. con CVS: todos los animales con un título de VNAb (en el día 20) por encima de 1,5 IU/ml sobrevivieron a la exposición en el día 21 (no se muestra). Por el contrario, no se produjo ninguna cantidad significativa de VNAb contra EBL-1b después de una sola inyección o después de una revacunación.

De este modo, se investigó la capacidad de la parte del sitio III de PV para llevar la parte del sitio II de EBL1 heterólogo, siguiendo la observación previa de que el plásmido quimérico pGMok-PV indujo VNAb contra los virus PV y Mok. Una sola inyección del plásmido quimérico pGEBL1-PV indujo de manera similar VNAb contra los virus PV y EBL-1b (figura 5b). Catorce días después de la inyección, los títulos fueron 2 IU/ml, y aumentaron hasta 17 IU/ml después de 80 días. El nivel de producción de VNAb contra EBL-1b fue siempre más elevado que aquel contra PV, pero la diferencia no fue significativa.

Tomados juntos, estos resultados demostraron claramente que los genes de G quiméricos que codifican la parte del sitio III de PV y la parte del sitio II de G de otros lisavirus, tales como EBL-1 b o Mok, son inductores muy potentes de VNAb contra virus progenitores. Por el contrario, el constructo de pGPV-Mok simétrico no induce VNAb contra ninguno de los virus PV o Mok (no se muestra).

#### Ejemplo 4

##### *Ensayos de protección contra lisavirus Europeos*

Se estudió la capacidad tanto del plásmido pGPV-PV homogéneo como del plásmido pGEBL1-PV quimérico para inducir la protección contra una exposición i.c. con virus que representan genotipos de lisavirus implicados en la transmisión de encefalomiелitis en Europa (CVS para GT1, EBL1b para GT5, y EBL2b para GT6). Se comparó su eficiencia con la de una vacuna disponible comercialmente (cepa PM: GT1) y una preparación de laboratorio (cepa PV: GT1) (figura 6).

La cadena plasmídica (pCneo) no indujo protección contra ningún virus (figura 6d, e y f). Por el contrario, pGPV-PV protegió al 70% de ratones BALB/c (y 85% de Suizos) contra CVS (figura 6d), al 30% contra EBL1b (figura 6e), y al 72% contra EBL2b (figura 6f). En las mismas condiciones, pGEBL1-PV protegió al 60% de ratones BALB/c contra CVS (figura 6d), al 75% contra EBL1b (figura 6e) y al 80% contra EBL2b (figura 6f). De este modo, si la inmunización con cualquiera de los dos plásmidos no mostró diferencia significativa en la protección contra CVS (GT1) y EBL2b (GT6), el pGEBL1-PV quimérico fue mucho más eficiente contra EBL1b (GT5), y es claramente el mejor candidato para la protección con inmunización a base de ADN contra los tres genotipos de lisavirus Europeo.

En cuanto a la protección inducida por vacunas de cultivo celular inactivado utilizando las cepas PM y PV contra las mismas exposiciones: una dosis humana de vacuna de PM diluida 1/10 protegió al 80% de ratones contra CVS (figura 6a), al 36% contra EBL1b (figura 6b), y al 80% contra EBL2b (figura 6c). En las mismas condiciones, 2  $\mu$ g de PV IPRV protegió al 100% de ratones tanto contra CVS (figura 6a) como contra EBL1b (figura 6b), y al 85% contra EBL2b (figura 6c). Parece que para una dosis de vacuna que protegió de 80 a 85% de los animales contra EBL2b, la cepa de PV protegió al 100% y la cepa de PM únicamente al 36% contra EBL1b. De este modo, la cepa de PM es menos efectiva que la cepa de PV contra EBL1b.

#### Ejemplo 5

##### *Expresión transitoria de genes de G de lisavirus*

Los plásmidos que contienen las secuencias codificantes de antígeno extraño asociadas con los genes de G de lisavirus truncado (pG-PVIII) o quimérico (pGEBL1-PV) se estudiaron para determinar su capacidad para transfectar de manera transitoria células Neuro 2a. Excepto para pG(B-CTL)<sub>2</sub>-PVIII, que indujo una tinción de IIF (en el citoplasma) únicamente después de la permeabilización, todos los plásmidos indujeron la expresión de antígenos relacionados con poliovirus y lisavirus en la membrana celular de células no permeabilizadas, como se dio a conocer previamente para los mismos plásmidos sin epítopos extraños.

Con fines ilustrativos, en la figura 7 se dan los resultados de la transfección obtenidos con pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV. Se evidenció la parte de G del virus de la rabia, reconocida por PV D1 MAb (figura 7A), y el inserto de poliovirus

reconocido por el C3 MAb (figura 7B) o el PAb anti poliovirus tipo 1 (figura 7C), mientras que no se observó tinción con los mismos MAb y PAb en células transfectadas con PClneo (figura 7D). Esto indica claramente que, excepto para pG(B-CTL)<sub>2</sub>-PVI, la glicoproteína pGEBL1-PV quimérica permitió la expresión del epítipo de células B de poliovirus, solo o en asociación con el epítipo de células CTL de LCMV, en la membrana de superficie celular bajo una forma nativa, mientras que se mantuvo la expresión de G de lisavirus.

#### Ejemplo 6

##### *Inmunogenicidad de epítipos extraños portados por la glicoproteína truncada*

El gen de pGPVIII truncado se utilizó para llevar y expresó los epítipos de célula B de C3 VP1 y de CD8<sup>+</sup>CTL de LCMV, en ratones después de la inmunización a base de ADN.

Aunque el gen de pGPVIII indujo células que producen IL-2 que pueden ser estimuladas *in vitro* mediante IPRV 21 días después de la inyección, no se observó producción después de 14 días (figura 8A). Sin embargo, se observó una producción significativa con pG(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII, después de 14 días (figura 8A). Esto indica que la fusión de epítipos extraños con GPVIII mejora de manera significativa la producción de células Th dirigidas a la parte del sitio III de G de la rabia.

Aunque pGPVIII no indujo anticuerpos antirabia en ausencia de IL-2 exógena (figura 9), el estudio cinético de anticuerpo inducido por pG(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII mostró que la producción significativa de anticuerpo ocurrió tanto contra G de la rabia como contra el péptido de poliovirus (figura 9). Esto también indica que la fusión de epítipos extraños con GPVIII mejora de manera significativa la producción de anticuerpo dirigido a la parte del sitio III de PV G de la rabia. Más aún, el GPVIII truncado fue capaz de llevar y permitir la expresión de epítipo de célula B de poliovirus *in vivo* con producción de anticuerpos.

La producción de anticuerpos inducida por p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII contra un péptido de poliovirus también se estudió después de cebar con pGPVIII o con el propio p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII (figura 10). Cuando se inyectó p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII sin cebador, y se controló 13 días (PBS/ p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII -D26-) o 39 días después (p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII -D0-), el título de anticuerpo anti-peptídico fue de 65 y 80, respectivamente. Sin embargo, si se realiza un cebado con pGPVIII o p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII, el título fue de 200 y 600, respectivamente. Esto demuestra claramente que los dos tipos de cebado mejoran la producción de anticuerpos contra un péptido de poliovirus.

#### Ejemplo 7

##### *Inmunogenicidad de epítipos extraños portados por la glicoproteína quimérica*

La inmunogenicidad tanto de epítipos celulares B como CD8 T, y la consecuencia de su inserción en la inmunogenicidad de la glicoproteína quimérica, se analizó de acuerdo con respuestas inmunes humorales y mediadas por células, tras la inmunización a base de ADN. Cuando se insertaron epítipos en el plásmido pGEBL1-PV quimérico, la inducción de células productoras de IL-2, capaces de ser estimuladas por IPLV, dependió de los epítipos insertados. Se obtuvieron dos tipos de resultados, y se muestran en la figura 8B: i) la producción de IL-2 inducida por pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV, pGEBL1-(CTL-B)-PV, y pGEBL1-(CTL)-PV fue similar a la inducida por pGEBL1-PV; y ii) se inhibió la producción de IL-2 inducida por pGEBL1-(B-CTL)-PV (no se muestran los datos) y pGEBL1-(B)-PV. En consecuencia, parece que la G de EBL1-PV quimérica puede llevar epítipos celulares B y CD8 T extraños sin efectos negativos en su capacidad para inducir células productoras de IL-2. Sin embargo, en lo que respecta al epítipo de células B, se observó un efecto de posición debido a que su inserción inmediatamente detrás de la secuencia de EBL1 fue perjudicial para la inducción de células auxiliares T estimuladas por G de lisavirus. Sin embargo, este fenómeno no se probó con pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV.

La inserción de epítipos extraños en pGEBL1-PV también se estudió para determinar su consecuencia en la inducción de anticuerpos contra péptido de poliovirus y VNAb tanto contra lisavirus de PV como de EBL1 (Tabla 1). Los cuatro plásmidos que contienen el epítipo de células B (pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL-B)-PV, pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV, y pGEBL1-(B-CTL)-PV) indujeron anticuerpo contra el péptido de poliovirus. Sin embargo, cuando el epítipo de células B siguió a la secuencia de EBL1 (pGEBL1-(B-CTL)-PV y pGEBL1-(B)-PV), la producción de anticuerpos fue más débil que cuando el epítipo de B se separó mediante el epítipo de células CD8 (pGEBL1-(CTL-B)-PV). Los resultados para pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV fueron intermedios. La inserción de epítipos extraños indujo una disminución de producción de VNAb anti-lisavirus, pero se mantuvo a un nivel elevado cuando los animales se inyectaron con pGEBL1-(CTL)-PV o pGEBL1-(CTL-B)-PV. Sin embargo, cuando el epítipo de células B se insertó inmediatamente detrás de la secuencia de EBL1, se observó una producción no tan grande de un VNAb anti-lisavirus.

En resumen, la G de EBL1-PV quimérica puede llevar y permitir la expresión *in vivo* de epítipos de células B neutralizantes de poliovirus y lisavirus, pero la presencia del epítipo de célula B de poliovirus, inmediatamente detrás de la secuencia de EBL1 (excepto para inserción de (B-CTL)<sub>2</sub>), es perjudicial para la inmunogenicidad tanto de la parte del sitio II como del sitio III de la glicoproteína quimérica. Por otro lado, cuando los epítipos extraños se fusionaron con la G de PVI truncada, se puede inducir tanto la producción de anticuerpos auxiliares T como no neutralizantes.

## ES 2 267 510 T3

### Ejemplo 8

#### *Protección contra una dosis letal de LCMV*

5 Ya que el epítipo celular CD8 T está implicado en la inducción de protección contra LCMV, se estudió la G truncada y quimérica que lleva el epítipo celular CD8\* T de LCMV, para determinar su actividad protectora (Tabla 2). El p(B-CTL)<sub>2</sub>-GPVIII truncado indujo únicamente una protección parcial. Cuando los epítopos celulares B y CD8 T se insertaron en el GEBL1-PV quimérico, se observó una protección significativa con pGEBL1-(CTL-B)-PV contra una exposición letal con LCMV (70% de ratones sobrevivieron). En estas condiciones, los animales que sobrevivieron eliminan completamente el virus cuando se controlaron mediante RT-PCR 21 días después de la infección (no se muestran los datos). Esto indica que la G quimérica es muy potente para llevar un epítipo celular CD8 protector. Sin embargo, en cuanto a las respuestas inmunes de anti-lisavirus y poliovirus, la inserción del epítipo celular B de poliovirus inmediatamente detrás de la secuencia de EBL1 indujo una inhibición de la actividad protectora del siguiente epítipo celular CD8.

15

### Ejemplo 9

#### *Secuencia PEST putativa*

20 Debido a que se observó claramente un efecto de posición perjudicial para la posición de la inserción del epítipo celular B antes o después del epítipo celular CTL, se analizó la presencia de secuencias PEST putativas en los diferentes plásmidos (figura 1D). Únicamente dos plásmidos (pGEBL1-(B)-PV y pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV) contuvieron secuencias PEST putativas debido a la unión del extremo de EBL1 y la secuencias del epítipo celular B. Sin embargo, la sustitución de la serina (S) en pGEBL1-(B-CTL)<sub>2</sub>-PV por una leucina (L) en pGEBL1-(B)-PV redujo el valor PEST de +8,38 a +4,20.

25

### Ejemplo 10

#### *Inmunización y exposición de perros*

30

Perros sabueso de 4 a 8 años se asignaron en cuatro grupos experimentales (Tabla 3). Se mantuvieron en jaulas aisladas, y se alimentaron con alimento comercial (400 g cada día). Se inyectaron de manera intramuscular en la pata posterior con 100 µg de plásmido (grupo A, B y C) o PBS (grupo D). El plásmido se inyectó en un sitio en el día 0, 21, 42, y 175 (grupo A), o en el día 0 y 175 (grupo C). También se inyectó en tres sitios (3x33 µg) en el día 0, 21, 42, y 175 (grupo B). Las muestras de sangre se recogieron (a partir de perforación de vena) en los días 0, 28, 49, 70, 120, 175, y 189.

35

Los anticuerpos neutralizantes de lisavirus se titularon mediante prueba de inhibición de foco fluorescente rápida (RFFIT), con las modificaciones descritas anteriormente de (28 de los perros) utilizar virus PV, CVS o FWR célula. Los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-PV, CVS o FWR se expresan en unidades internacionales por ml (IU/ml) utilizando el 2nd International Standard (Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca) como referencia, o como la dilución de suero recíproca que inhibe 50% del foco fluorescente. En estas condiciones, un título de 40, 70, o 60 (dilución de suero recíproca) fue equivalente a 0,5 IU/ml contra PV, CVS o FWR, respectivamente.

40

Como se muestra en la figura 11, se puede inducir un anticuerpo neutralizante de virus (VNAb) mediante el plásmido que contiene el gen que codifica los grupos de proteína G (A, B y D), mientras que no se detectó ningún anticuerpo en animales inyectados con PBS (grupo D), cualquiera que sea el protocolo de inyección. Los niveles más destacados de VNAb se obtuvieron después de una inyección y una revacunación en el día 21 (grupo A), o en el día 175 (grupo C). Conforme se produce la seroconversión para 0,5 IU/ml, se puede concluir que todo los animales se habían seroconvertido. Más aún, de acuerdo con la bibliografía, se puede concluir que todos los perros inyectados con plásmido están protegidos contra un ataque de virus de rabia.

50

Estos resultados son representativos y la dosificación se puede extrapolar a otros animales susceptibles a la rabia, incluyendo seres humanos.

55

### Ejemplo 11

#### *pG-PVIII como un portador para proteína extraña: dominio de P. falciparum que media la adhesión a sulfato de condroitina A: un receptor para infección de placenta humana*

60

La malaria durante el primer embarazo provoca un alto índice de muerte fetal y neonatal. La disminución de susceptibilidad durante embarazos subsecuentes se correlaciona con la adquisición de anticuerpos que bloquean la unión de glóbulos rojos infectados a sulfato de condroitina A (CSA), un receptor para parásitos en la placenta. De manera reciente, se ha identificado un dominio dentro de una proteína 1 de membrana de eritrocito de Plasmodium falciparum (PfEMP-1) que se une a CSA (Buffet *et al.* *P. falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: A receptor for human placental infection (1999) *P.N.A.S.* **96**:12743-12748). Se clonó un gen var que se expresa en glóbulos rojos parasitados de unión a CSA (PRBCs). El gen tuvo 8 dominios de tipo receptor, y se desmontó que el dominio de tipo unión de Duffy (DBL), llamado DBL-3, une CSA y exhibe la misma especificidad de unión que PRBCs.

65

## ES 2 267 510 T3

Puesto que los anticuerpos protectores presentes después del embarazo bloquean la unión a CSA de parásitos de diferentes partes del mundo, DBL-3, aunque variante, puede inducir inmunidad reactiva cruzada que protegerá a mujeres embarazadas y sus fetos. De este modo, el dominio DBL-3 se vuelve un candidato como una vacuna para mujeres embarazadas en África.

El dominio DBL-3 contiene un número de cisteínas que parecen ser cruciales para el pliegue correcto de la región de unión a CSA. Este pliegue no puede ser lográble, muy probablemente, en sistemas de expresión bacteriana (datos no publicados). Un enfoque importante para inducir anticuerpos capaces de interferir con la unión a CSA de eritrocitos infectados es aplicar una estrategia de vacuna de ADN utilizando el dominio DBL-3 fusionado a la parte PV III de la rabia. Se ha mostrado que la parte PVIII de la glicoproteína de la rabia promueve función auxiliar eficiente.

TABLA 1

*Producción de anticuerpos inducida por el plásmido pGEBL1-PV quimérico que porta varias combinaciones de epítomos extraños de células B y CD8<sup>+</sup> T*

Plásmido inyectado	Anticuerpo neutralizante (U/ml) contra:		Anticuerpo antipéptido de poliovirus (Dilución recíproca)
	Virus de la rabia	Lisavirus 1 de murciélago Europeo	
pGEBL1-(B-CTL)2-PV	0,9 (0,05)	1,1 (0,07)	1100 (200)
pGEBL1-(CTL-B)-PV	1,8 (0,2)	8,0 (1,0)	1510 (490)
pGEBL1-(B-CTL)-PV	0,06 (0,06)	0,6 (0,07)	810 (210)
pGEBL1-(CTL)-PV	2,6 (0,2)	5,2 (0,2)	0 (0)
pGEBL1-(B)-PV	0,1 (0,01)	0,21 (0,09)	355 (45)
pGEBL1-PV	5,9 (2,1)	21,9 (1,8)	0 (0)
pCIneo	0 (0)	0 (0)	0 (0)

La tabla 1 muestra la producción de anticuerpos inducida por el plásmido pGEBL1-PV quimérico que porta varios epítomos extraños. Los ratones BALB/c (tres para cada plásmido) se inyectaron con 50 µg de varios plásmidos en cada músculo tibial. El suero se analizó en el día 21 para determinar el anticuerpo neutralizante del virus EBL1 o de la rabia, mediante el método de RFFIT (título expresado en IU/ml), y para determinar el anticuerpo antipéptido de poliovirus mediante ELISA. Los resultados se expresan como el título medio, y la desviación estándar se da en paréntesis.

## ES 2 267 510 T3

TABLA 2

*Protección inducida por el plásmido pGPVIII truncado y el pGEBL1-PV quimérico que codifican el epítipo CD8<sup>+</sup> de LCMV*

5

Plásmido inyectado	Supervivencia de animales (%)
pCIneo	0/10 (0)
p(B-CTL)2-GPVIII	2/5 (40)
pGEBL1-(B-CTL)-PV	0/10 (0)
pGEBL1-(CTL-B)-PV	7/10 (70)

25

La tabla 2 muestra la protección inducida por el plásmido pGEBL1 quimérico que porta los epítipos CD8<sup>+</sup> de LCMV. Los ratones BALB/c (tres para cada plásmido) se inyectaron con 40 µg de diversos plásmidos, y se expusieron i.c en el día 21. El porcentaje de animales que sobrevivieron se da entre paréntesis.

30

TABLA 3

*Característica de perros y protocolo de inyección*

35

Grupo	Número de perro	Sexo*	Edad (Años)	Inyección		
				Producto inyectado	Número de sitio	Día
A	1	M	8	Plásmido	1	0, 21, 42 y 175
	2	F	6	Plásmido	1	0, 21, 42 y 175
	3	F	6	Plásmido	1	0, 21, 42 y 175
B	4	F	6	Plásmido	3	0, 21, 42 y 175
	5	M	6	Plásmido	3	0, 21, 42 y 175
	6	F	8	Plásmido	3	0, 21, 42 y 175
C	7	M	4	plásmido	1	0 y 175
	8	F	7	plásmido	1	0 y 175
	9	F	4	plásmido	1	0 y 175

65

# ES 2 267 510 T3

TABLA 3 (continuación)

Grupo	Número de perro	Sexo*	Edad (Años)	Inyección		
				Producto inyectado	Número de sitio	Día
D	10**	M	4	PBS	1	0, 21, 42 y 175
	11	M	4	PBS	1	0, 21, 42 y 175
	12	M	4	PBS	1	0, 21, 42 y 175
* M: macho; F: hembra ** Descartado en el día 160 (enfermo)						

## ES 2 267 510 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula portadora que contiene una secuencia polinucleotídica quimérica, en la que dicha secuencia polinucleotídica quimérica comprende una secuencia que codifica una parte de una glicoproteína que contiene al menos el sitio III de la glicoproteína de lisavirus, y comprende además una secuencia que codifica un antígeno heterólogo distinto de un antígeno de un lisavirus.
- 10 2. Molécula portadora según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia polinucleotídica quimérica comprende además una secuencia que codifica un dominio transmembránico de una proteína transmembránica.
3. Molécula portadora según la reivindicación 2, en la que dicha secuencia polinucleotídica quimérica comprende además una secuencia que codifica un dominio citoplásmico de dicha glicoproteína de dicho lisavirus.
- 15 4. Molécula portadora según las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha secuencia polinucleotídica quimérica comprende una secuencia que codifica al menos la mitad C terminal de una glicoproteína de lisavirus.
5. Molécula portadora según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia polinucleotídica quimérica comprende además:
- 20 a) una secuencia que codifica una secuencia del sitio II de una glicoproteína de un lisavirus;
- b) un dominio transmembránico de una proteína transmembránica; y
- 25 c) un dominio citoplásmico de una proteína transmembránica.
6. Molécula portadora según las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho antígeno es un antígeno de tumor.
7. Molécula portadora según las reivindicaciones 2, 3 ó 5, en la que dicho dominio transmembránico procede de un proteína distinta de una glicoproteína de lisavirus.
- 30 8. Polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica quimérica de la molécula portadora según las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. Composición inmunogénica que comprende la molécula portadora de las reivindicaciones 1 a 7, o un polipéptido según la reivindicación 8.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

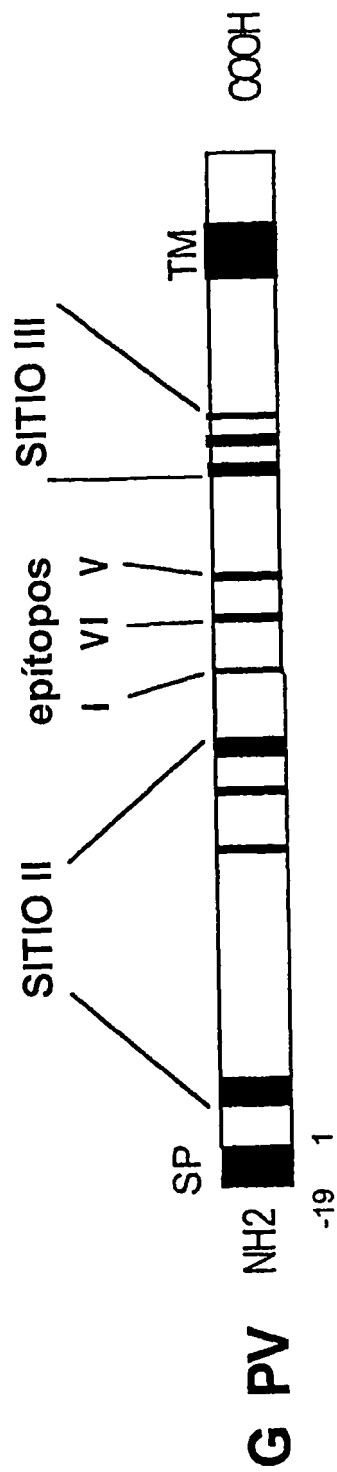


Figura 1A

**G PV-PV** -19  
252 | 253  
505

Figura 1A (continuación)

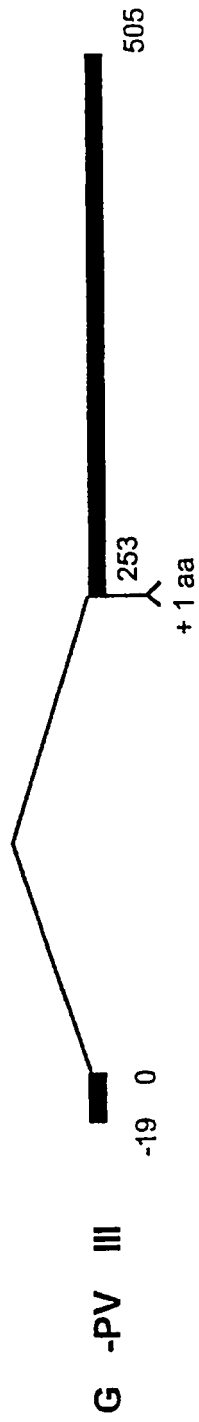


Figura 1A (continuación)

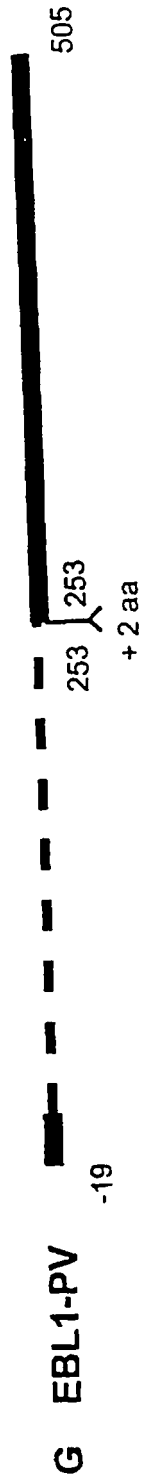


Figura 1A (continuación)



Figura 1A (continuación)



Figura 1A (continuación)

VI

	230		247		253	258	264		275		290
	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
PV-PV	VIGLR	MDGTWVSMQTSNETKWC...	PPQLINLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRECLDALESI								
-PVIII	.....	.....	<u>S</u>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
EBL1-PV	-P-M-	-L-KTEAPE-	<u>SNS</u>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Mok-PV	RP-I-	F-	FTKPDVHV	.....	T-N	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PV-Mok	.....	.....	.....	.....	.....	I-ND-L	.....	I-DII	.....	T	.....
Mok-Sad	KP-I-	F-	FTKPD	.....	DK-V	.....	.....	.....	.....	R	.....

Figura 1B

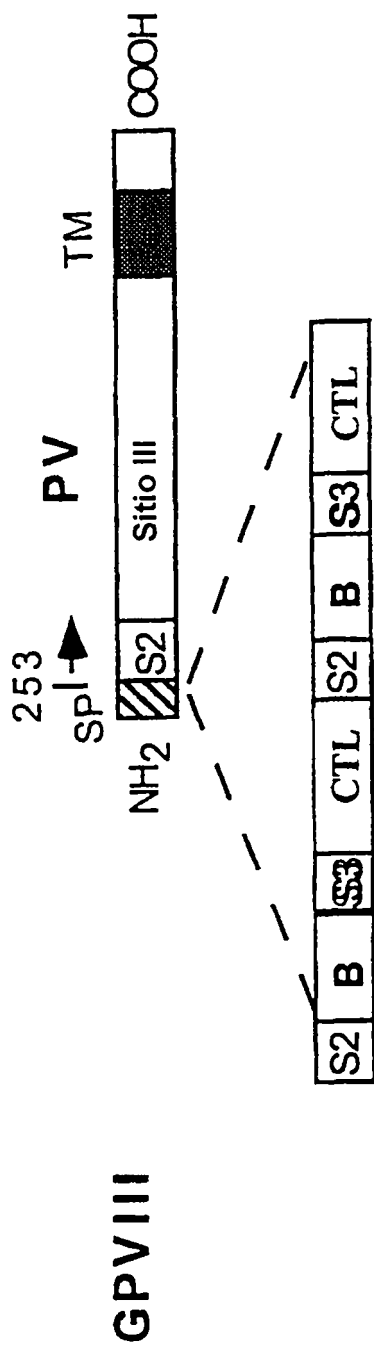


Figura 1C

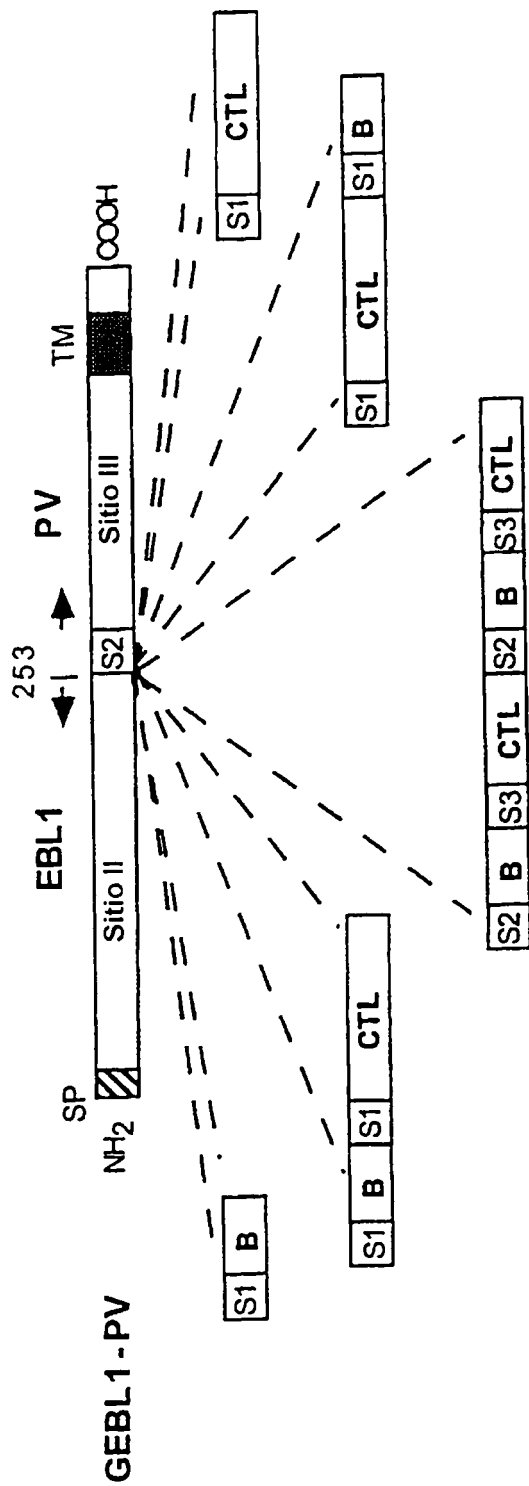


Figura 1D



	110	130	150	170	190
			II		II
FV	d-a-m-m	v-k-y	a-l-p-rs-rv-g-n-vav-ty-s		ri-m-n-r
USA7-BT	d-a-hd-m	v-k-y	a-l-p-s-rv-s-l-iv-ty-s		ve-rl-t-n-r
PL	ef-n-v	y	p-s-k-t-a-vp-i-s		l-k-m
EBL1POL	s-t	k	n-y-lasp-aic-p		i-k
EBL1FRA	s-t	k	n-y-lasp-alc-p		i-k
EBL2FIN	s-s-n	v-v	n-y-i-l-v-qv-s		v
EBL2HOL	s-sc-t	tct	a-y-i-l-v-qv-s		v
Duv1SAF	ns	k	a-k-y-r-el-g-p-e		ss-i-r-m
Duv2SAF	ns	k	a-k-y-r-el-g-p-e		ss-i-r-m
Lag1NGA	l-h-s	ns	i-e-v-sr-p-t-rfy-s-a		l-dd-ls-a-v-t
Lag2CAR	l-fh-s	ns	i-e-v-sr-p-p-g-v-kfy-s-p		l-l-da-ls-ma-i-t
Mok3ETP	a	s	i-e-i-gr-p-s-kly-v-s-t		l-l-d-sis-i-s
Mok4ZIM	a	s	i-e-i-gr-p-s-kly-v-s-t		l-l-d-sis-i-s
CONSENS	-ACRDAYNKIAGDPRIEESLHNPYPDSHWLRVTTTKESLLIISPSVVDMDAYDKKIHSGKFPNGKCSG-SFSPSPFC-TNHDYTIWMPENPCLSCDIFTTSKG				

FIGURA 1E (continuación)

```

330 III      a 350      III      370      390      410
-----f-----t-n-----iv-----v-----n-----s-----m-----v-----m-----ng-----
USA7-BT  -----f-----ikt-n-v-----ev-k--pv-----n-----s-----m-----v-----m-----eg-----
PL       -----v-----nq--t-n-----vre-----py-----s-----m-----l-----yz-----l-----
EBL1POL  -----l-----k-v-----m-----ys-i-----s-g-d-----m-----m-----r-----r-----
EBL1FRA  -----l-----t-v-----m-----ys-i-----s-g-d-----m-----m-----r-----r-----
EBL2FIN  -----v-----i-----tdv-----m-----y-h-----s-----m-----m-----i-----g-----
EBL2HOL  -----i-----tdv-----m-----y-h-----s-----m-----m-----i-----g-----
Duv1SAF  -----f-----e-----k-----y-h-i-----g-ki-----v-k-----n-----s-----d-----
Duv2SAF  -----f-----e-----k-----y-h-i-----g-ki-----v-k-----n-----s-----d-----
Lag1NGA  -----l-----qtnv--lk-dn-s--l-----innq-va-de-----k-----i-----s-wk-md-fkaa-f-----ie-gsl-n-gd-de-d-----
Lag2CAR  -----q-----tnv--lf-ds-nd-l-----mnkq-vdsyr-----k-h--i-----s-k-md-kaa-f-----i-qnsl--gd-d-----
Lag3SAF  -----q-----tnv--lf-ds-nd-l-----mnkq-vdsyr-----k-l--i-----s-k-md-kaa-f-----i-qnsl--gd-----
Lag4SAF  -----q-----tnv--lf-ds-nd-l-----mnkq-vdsyr-----k-l--i-----s-k-md-kaa-f-----i-qnsl--gd-----
Mok1SAF  -----l-----q-----tnvy--f-dr-ad-l-----v-qq-mdpv--l-----k-----qi-----eq-k-md-kaa-f-----isqea-----gd-----
Mok3ETP  -----l-----q-----tnvy--f-dr-ad-l-----v-qq-mdpvk--l-----k-----qi-----eq-k-md-kaa-f-----inrea-----gn-d-----
Mok2ZIM  -----l-----q-----tnvy--f-dk-ad-l-----v-qq-mepvk--l-----k-----qi-----eq-k-md-kaa-f-----isrea-----gd-d-----
CONSENS  GKAYTIINKTLMEADAHYKSVREW-EIIPSKGCLNAGGRCHPH-NGVFNGLIIGPDGHVLIPEMQSALLQQHIELLESVPLRHRPLADPSTVFKKDDAEADDFVE

```

FIGURA 1E (continuación)



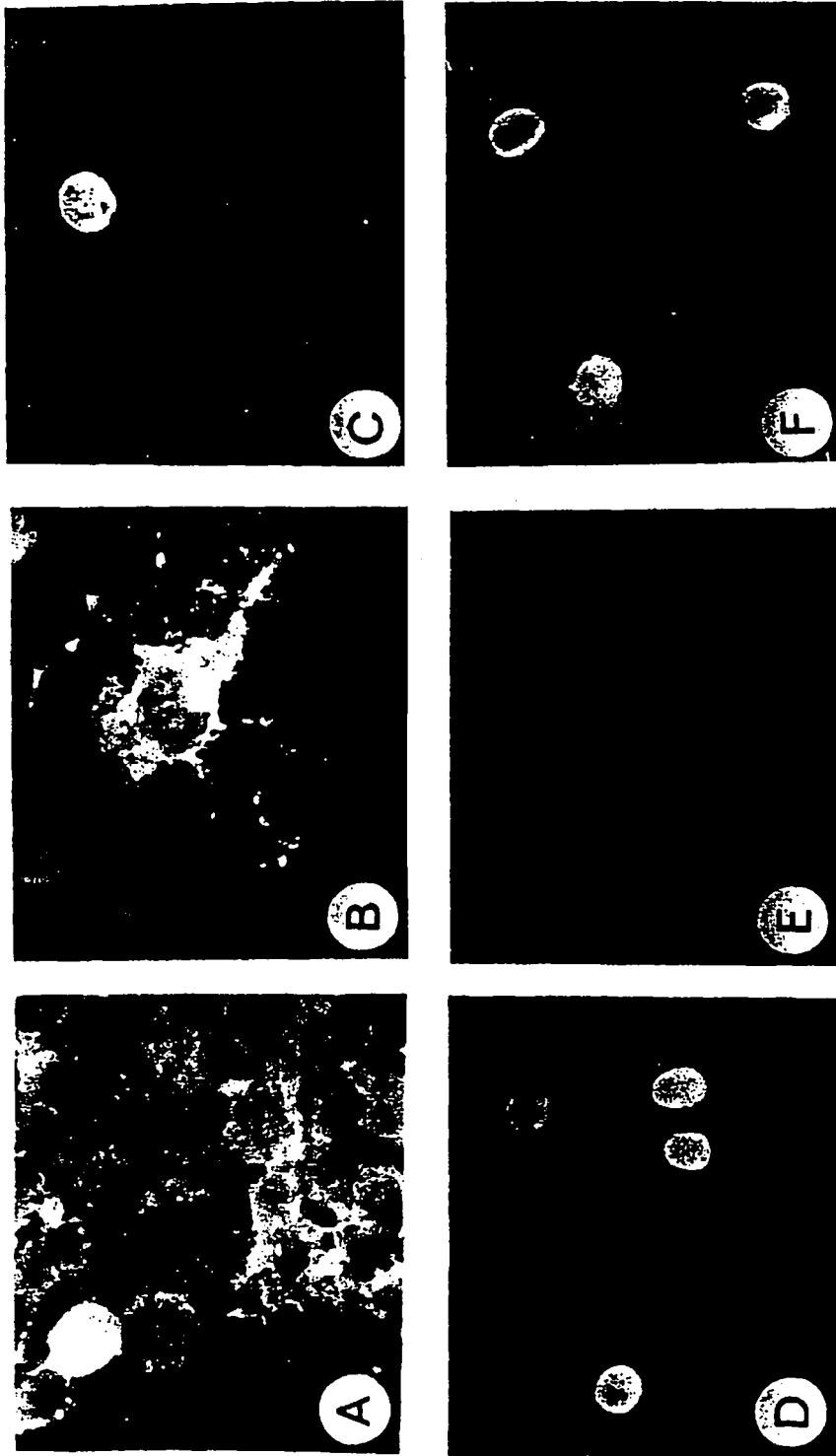


Figura 2

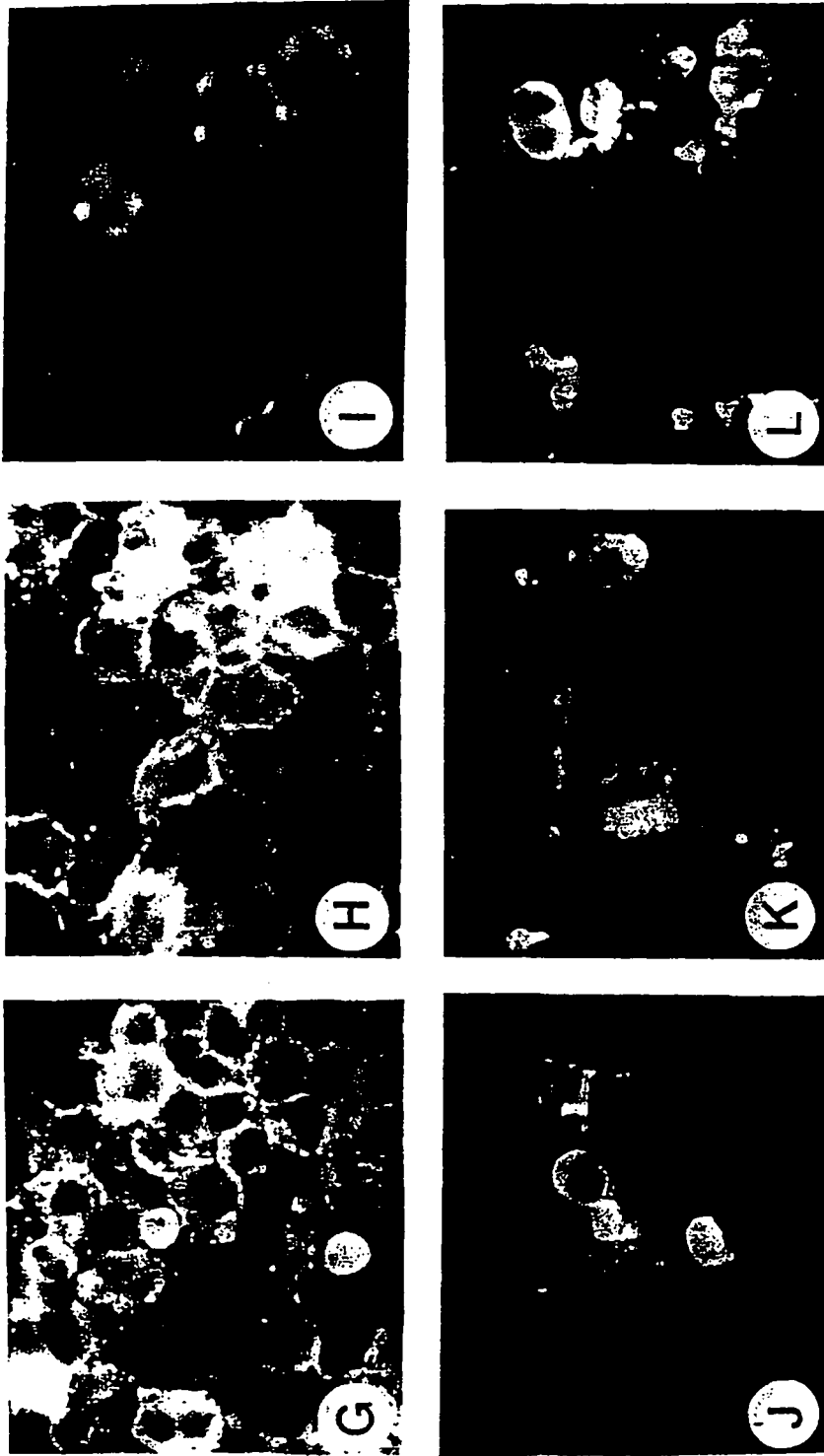


Figura 2 (continuación)



Figura 2 (continuación)

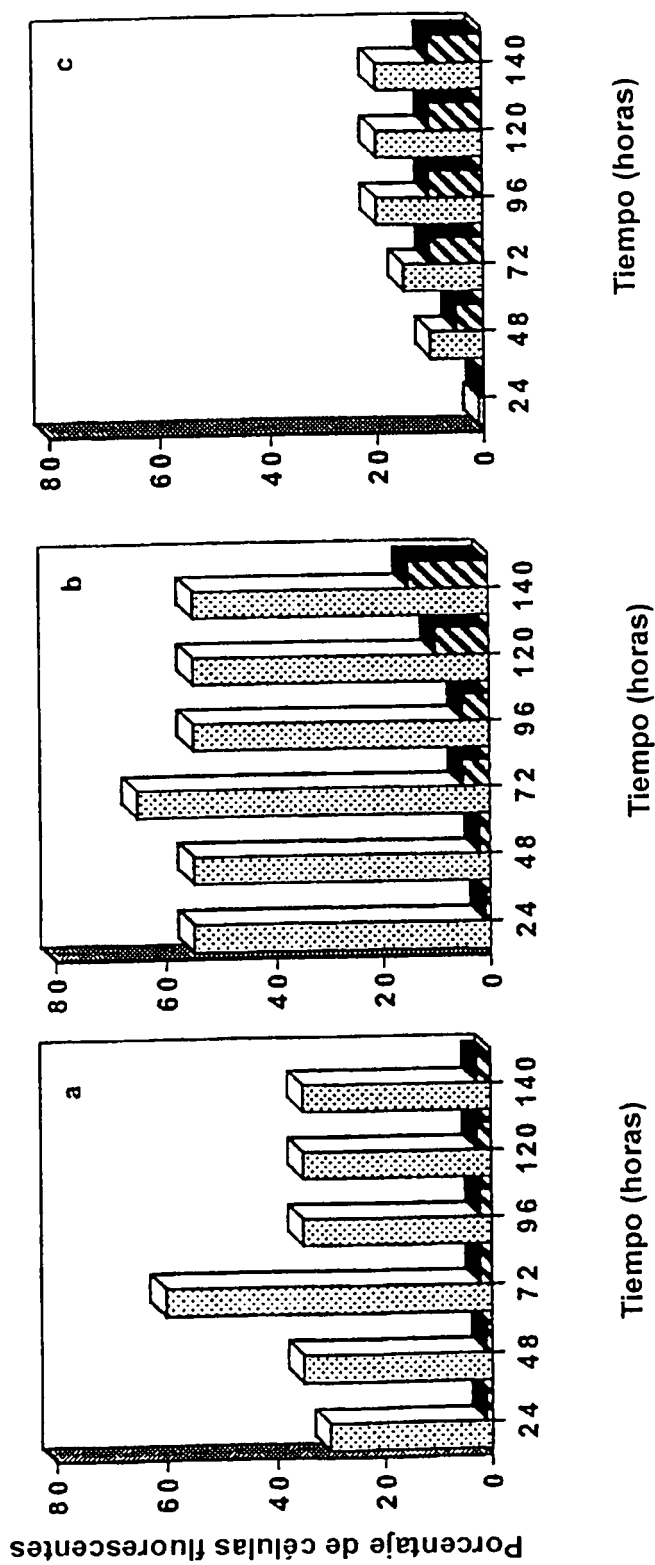


Figura 3

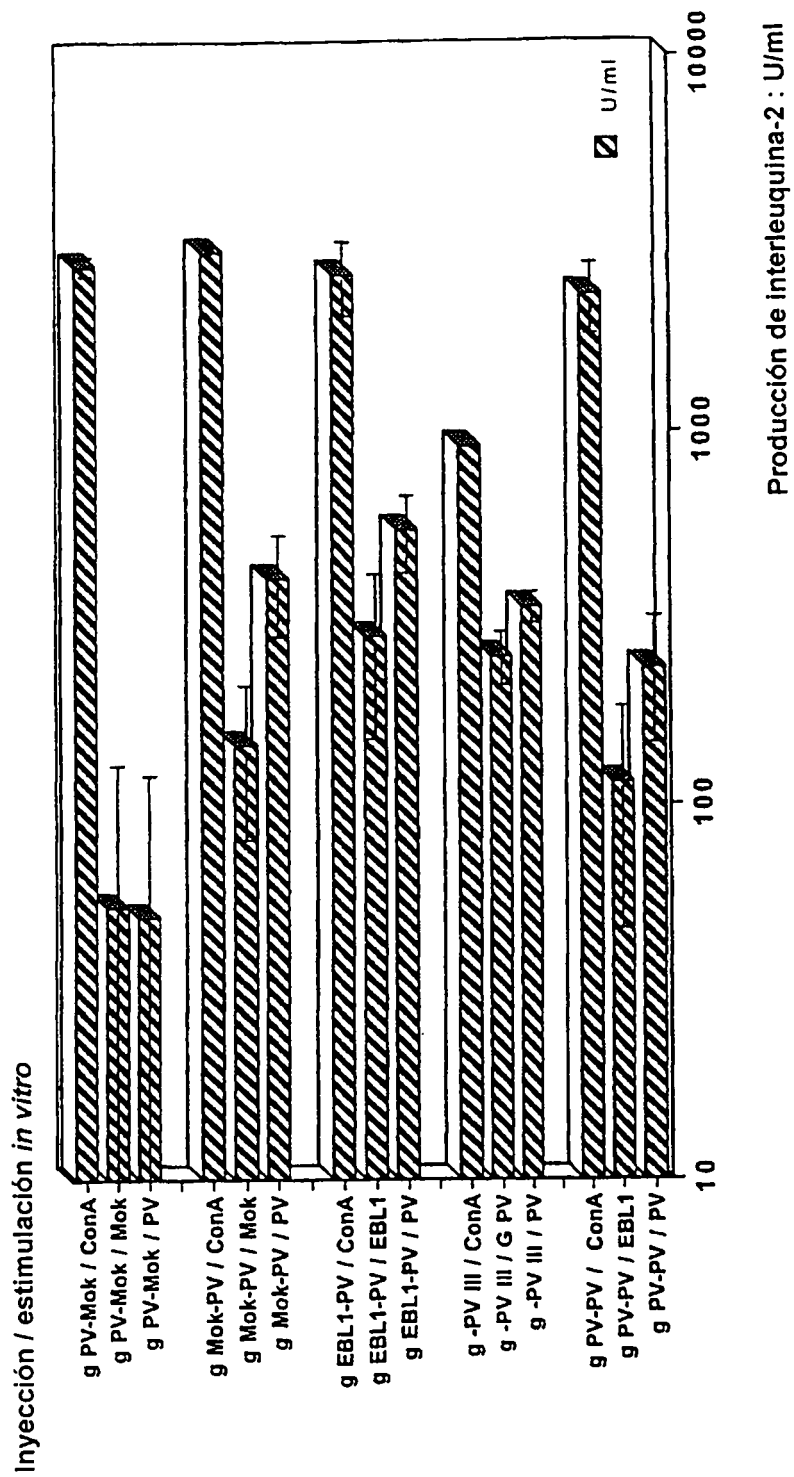


Figura 4

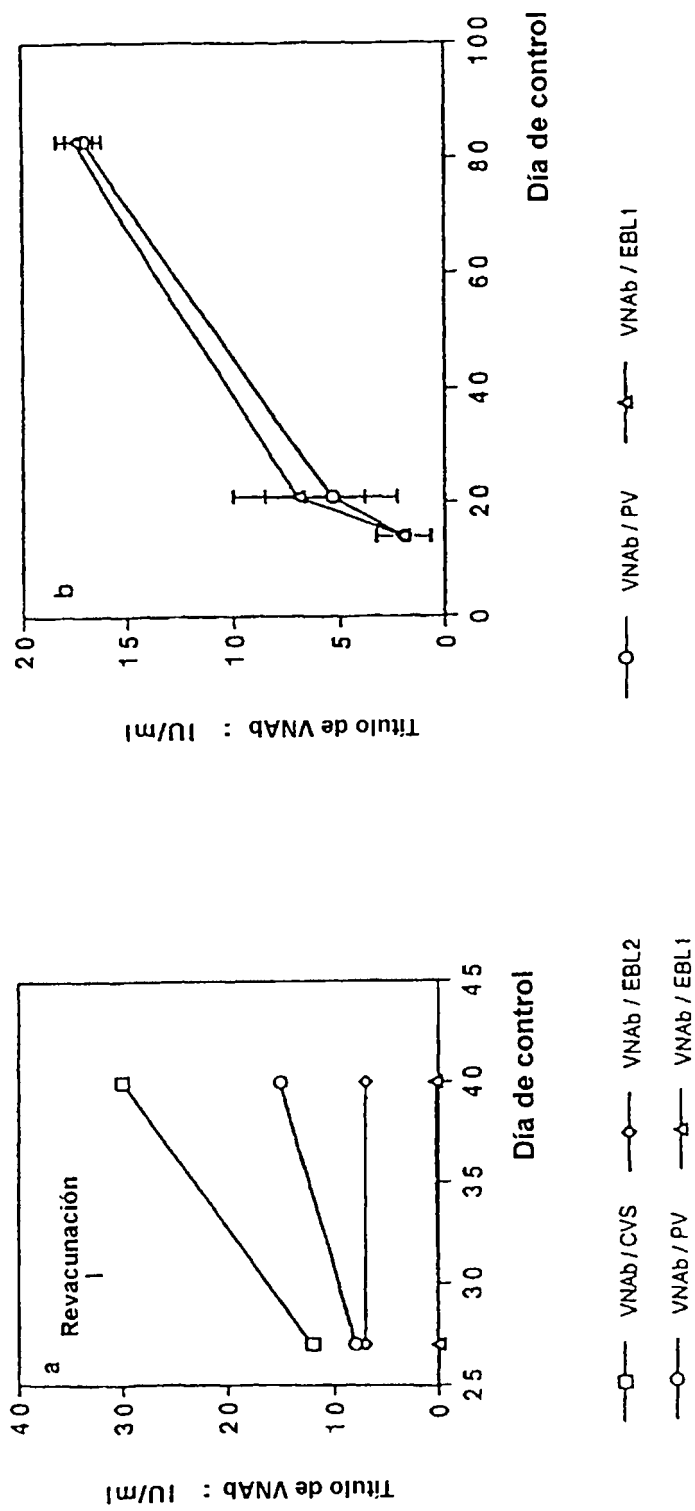


FIGURA 5

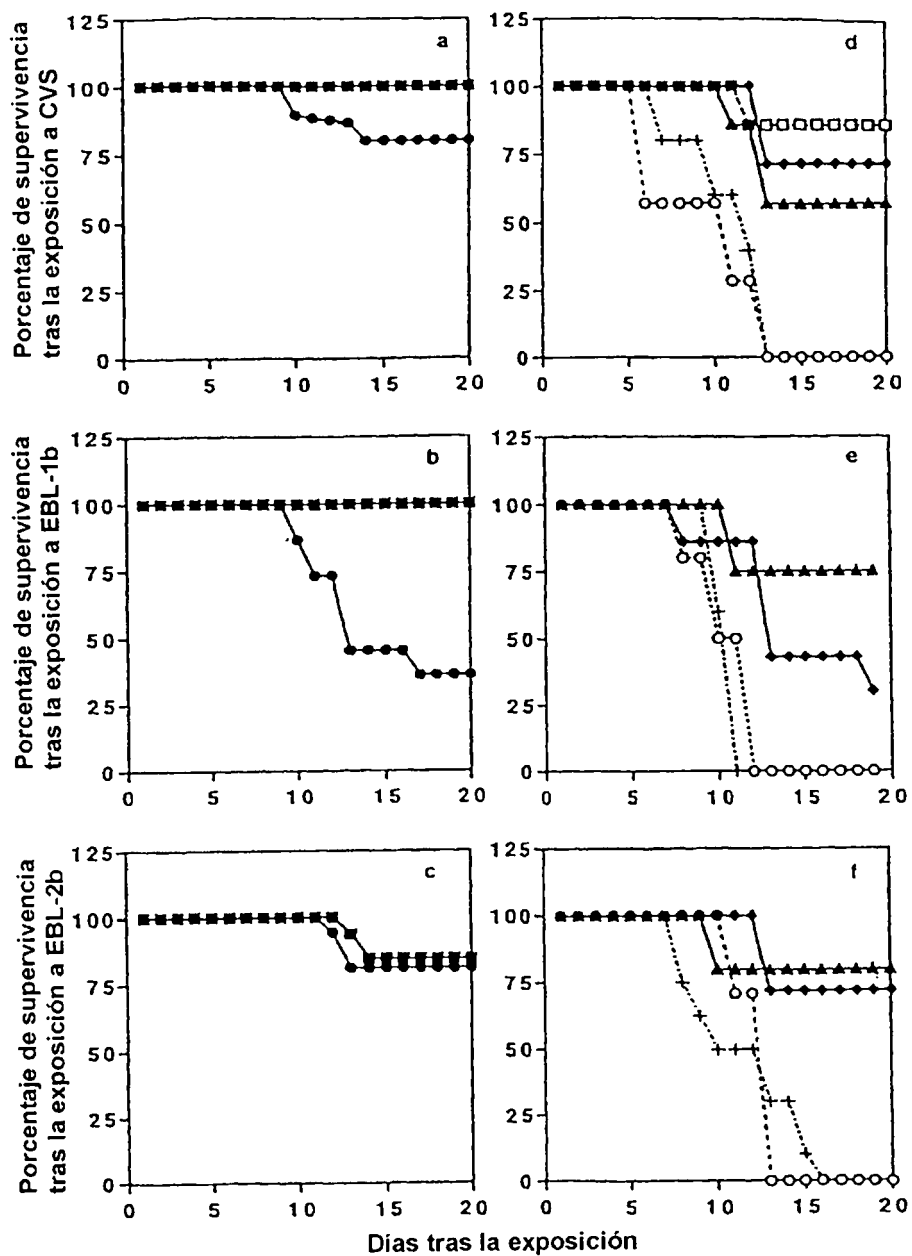


FIGURA 6

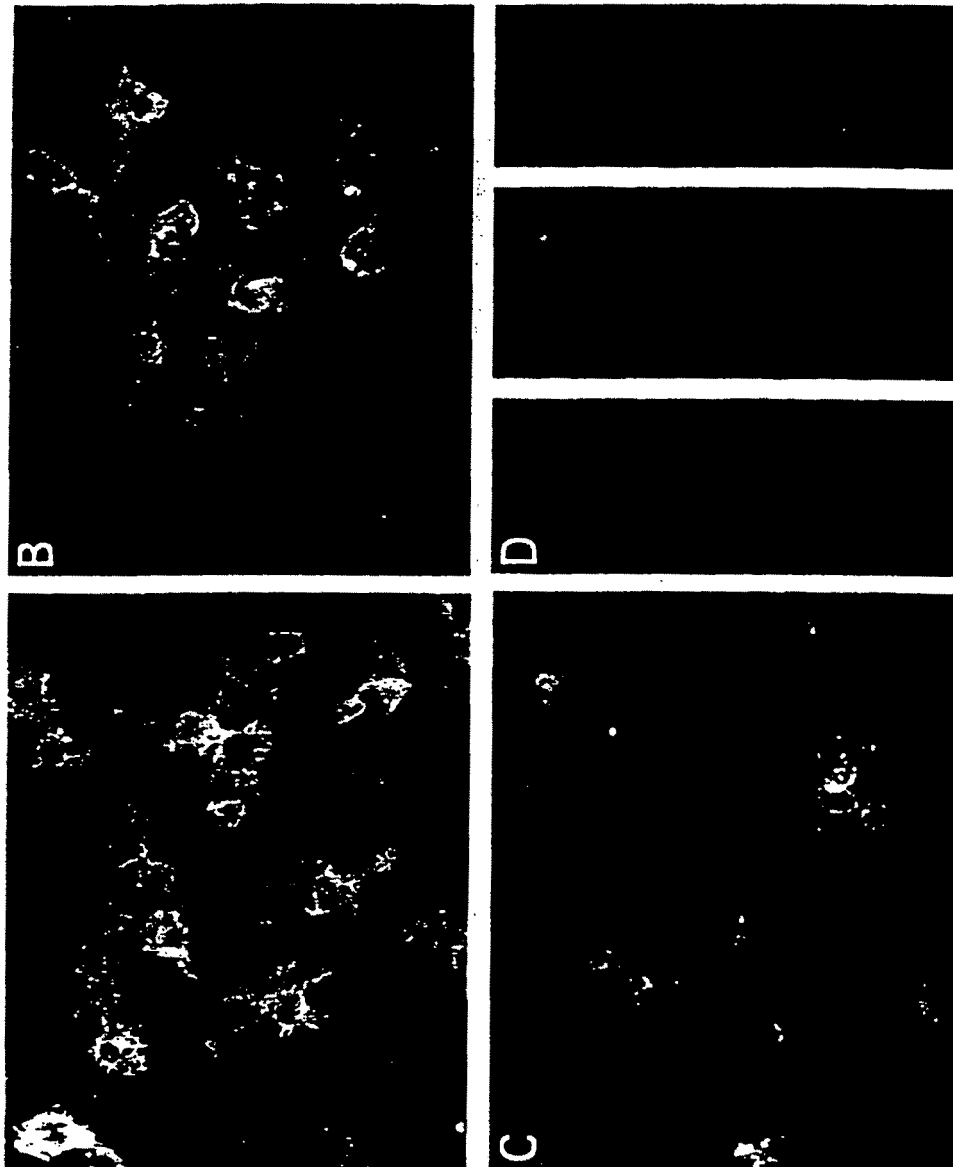


Figura 7

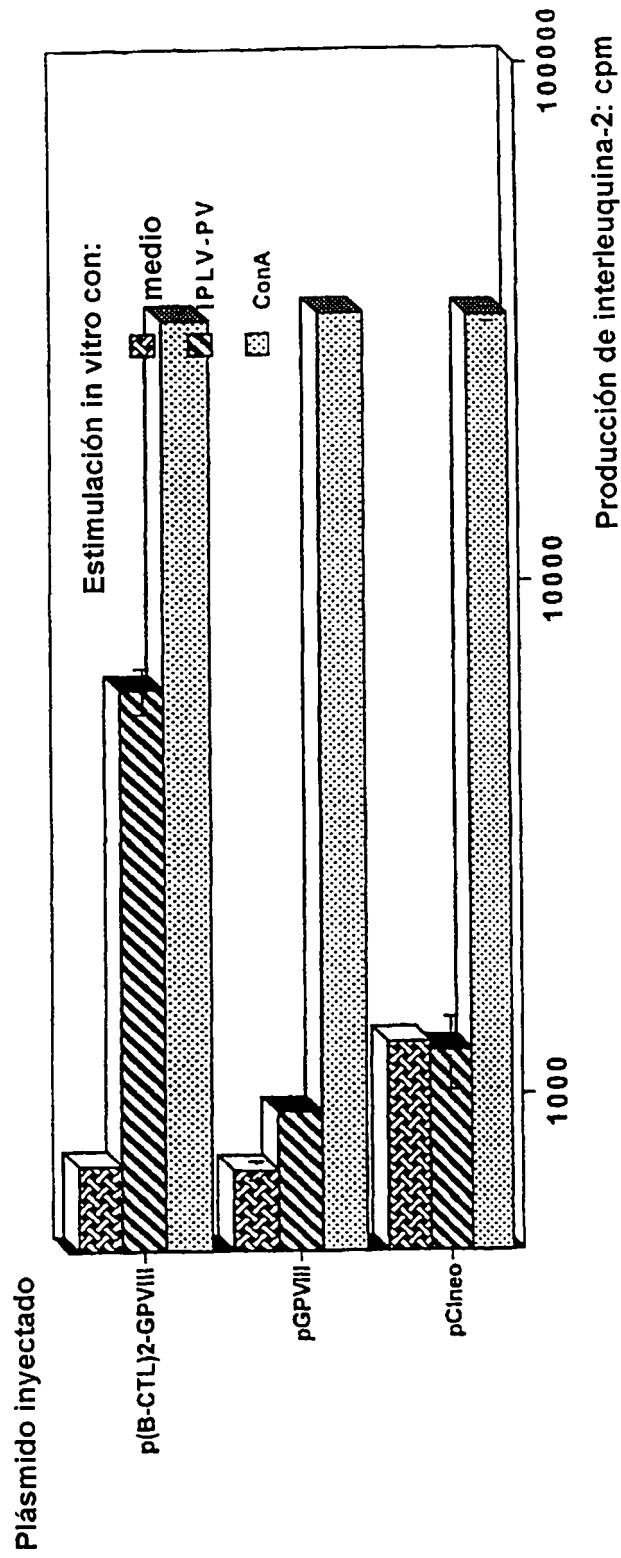


Figura 8

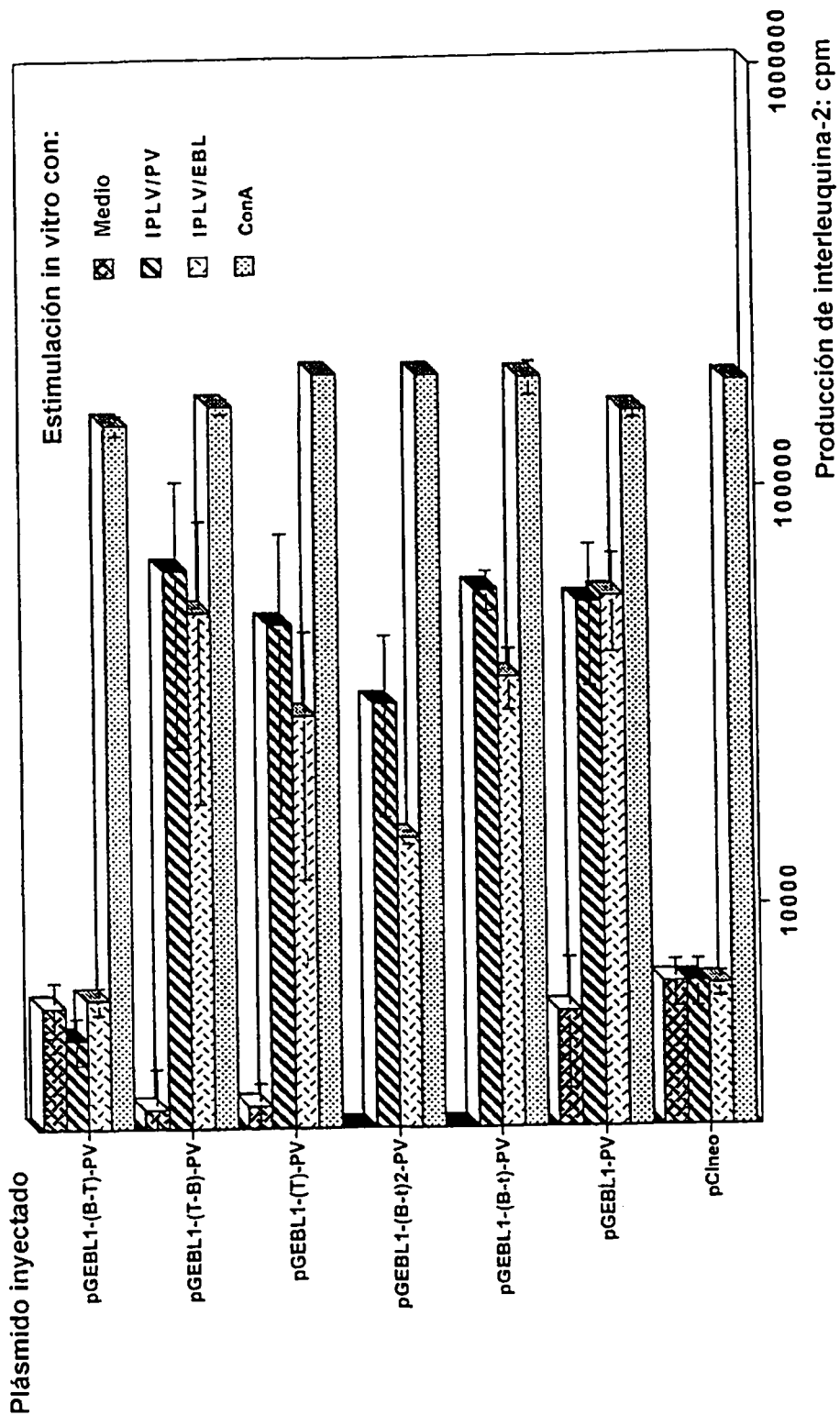
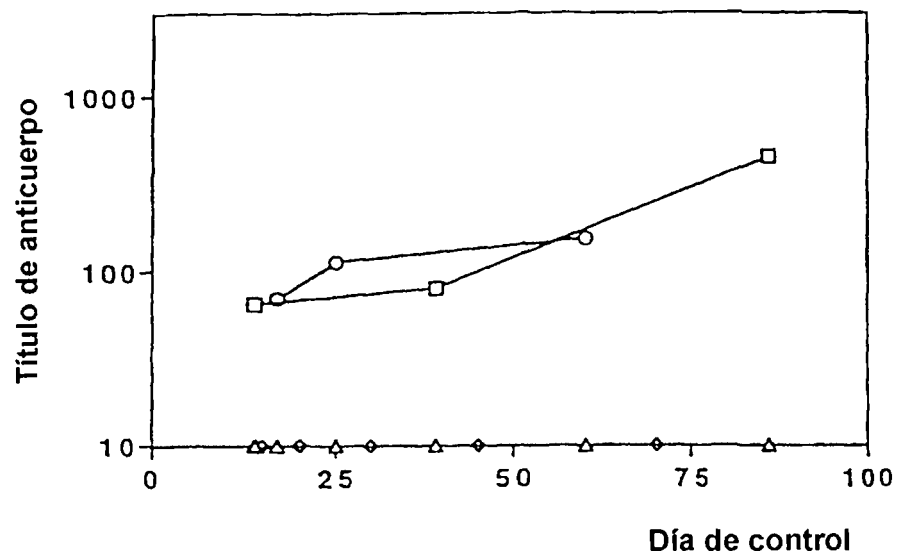


Figura 8 (continuación)



- p(B-CTL)2-GPVIII (Polio)
- p(B-CTL)2-GPVIII (Rabia)
- △— pGPVIII (Rabia)
- ◇— pCINeo (Rabia, polio)

FIGURA 9

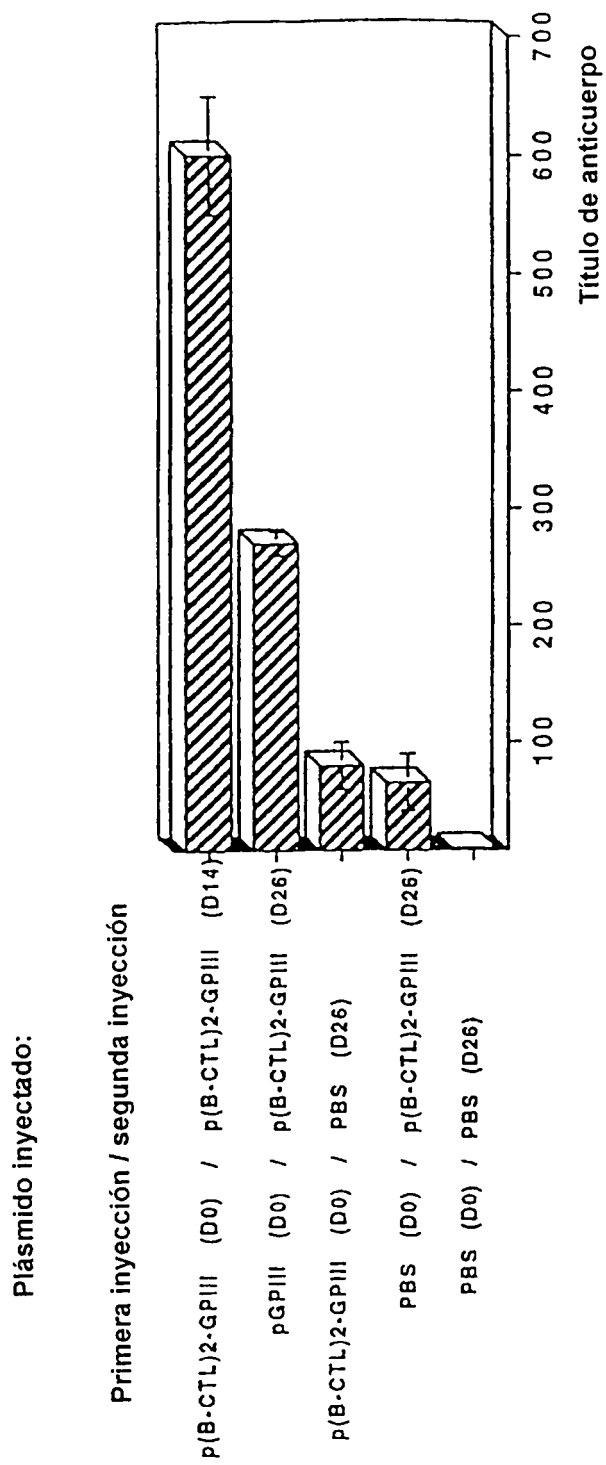


FIGURA 10

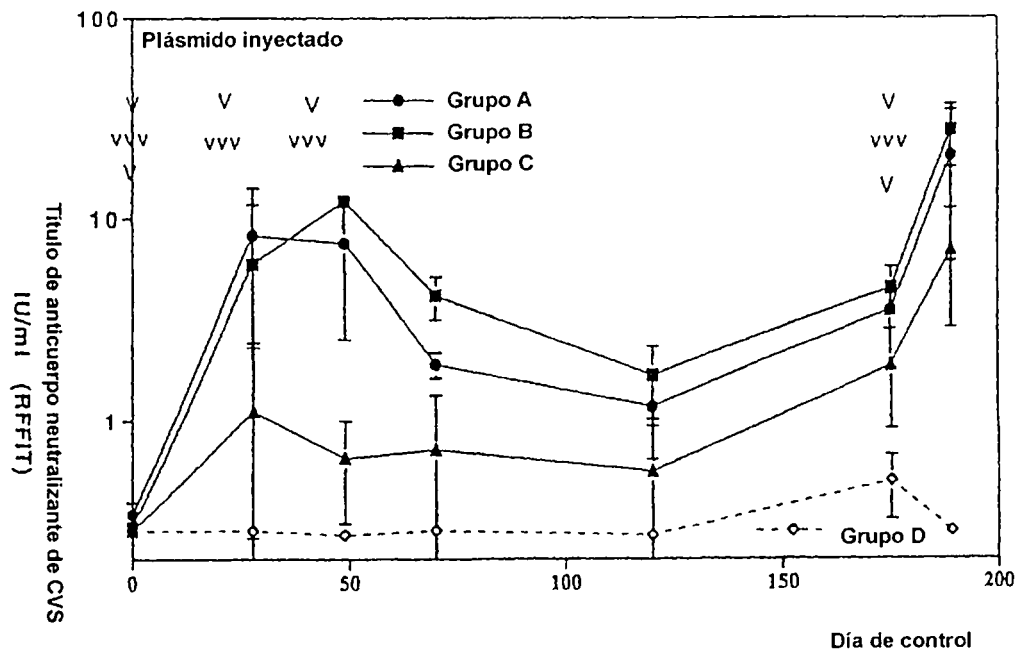


FIGURA 11

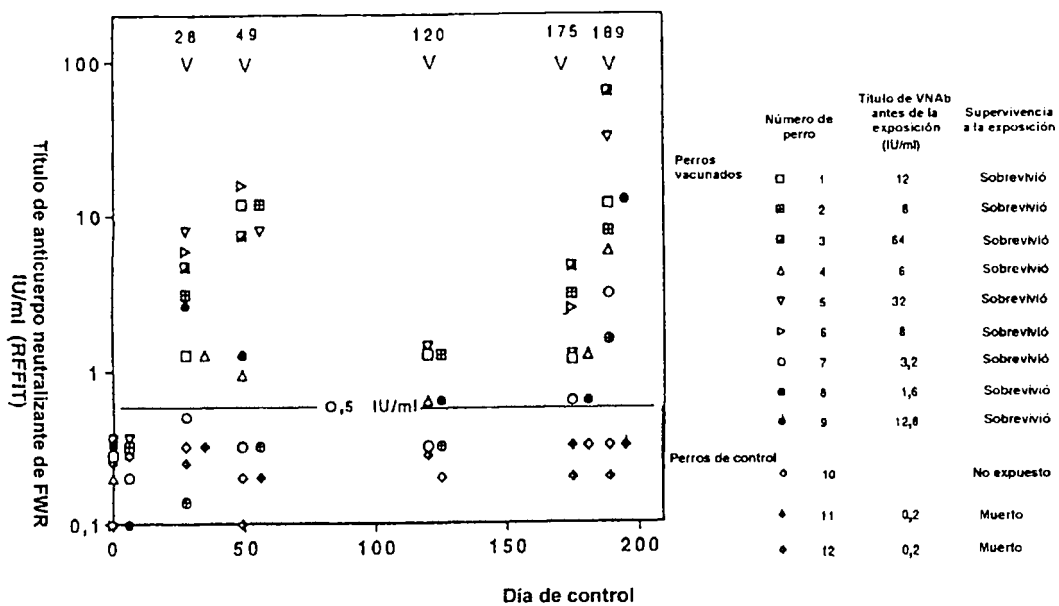


Figura 12

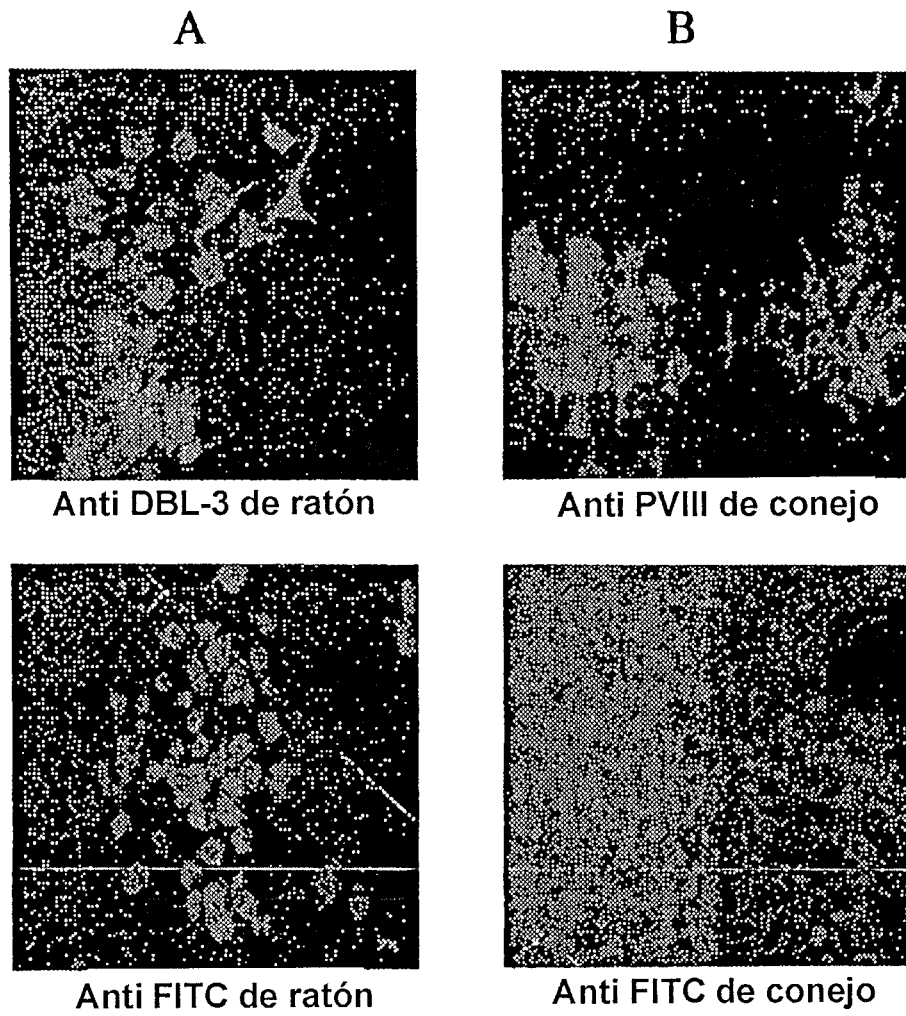


Figura 13

# ES 2 267 510 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Institut Pasteur	
5	<120> Acidos nucléicos y polipéptidos de lisavirus quimérico	
	<130> d18780	
	<150> US60/129501	
	<151> 1999-04-15	
10	<160> 17	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 34	
15	<212> ADN	
	<213> Virus de la Rabia	
	<400> 1	
20	ttctagagcc accatggttc ctcaggctct cctg	34
	<210>2	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la Rabia	
	<400> 2	
30	attgatcaac tgaccgggag ggc	23
	<210> 3	
35	<211> 98	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebadores de adaptador sintético	
	<400> 3	
45	<b>aattctagag cgcaccat ggtcctcag gctcctgt ttgtaccct tctggtttt</b>	<b>60</b>
	<b>ccattgtgt ttggaagaa tccccccc ggtcagtt</b>	<b>98</b>
	<210> 4	
50	<211> 98	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebadores de adaptador sintético	
	<400> 4	
60	<b>gatcaactga ccggggggg aattctccc aaaacacaat ggaaaaacca gaaggggtac</b>	<b>60</b>
	<b>aaacaggaga gcctgaggaa ccatggtggc ggctctag</b>	<b>98</b>
65	<210> 5	
	<211>54	
	<212> ADN	

## ES 2 267 510 T3

<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebadores de adaptador sintético  
5 <400> 5  
aatttcccaa totacacat cccggataaa atcggaccgt ggtcacctat tccg 54

10 <210>6  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
15 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebadores de adaptador sintético  
<400> 6  
20 aattcggaat aggtgaccac ggtccgattt tatccgggat ggtgtagatt ggga 54

<210> 7  
25 <211> 63  
<212> ADN  
<213> Virus de la Rabia  
<400> 7  
30 ccgtggtcac ctattgatat aaacatctc agctgcccaa acaactgat cgtggaagatgag 63

<210> 8  
35 <211> 27  
<212> ADN  
<213> Virus de la Rabia  
<400> 8  
40 ggaattcgag caccattctg gagcttc 27

<210> 9  
45 <211> 11  
<212> PRT  
<213> Proteína VP1 de poliovirus  
50 <400> 9  
Asp Asn Pro Ala Ser Thr Thr Asn Lys Asp Lys  
1 5 10

55 <210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
60 <213> nucleoproteína de virus de coriomeningitis linfocítica  
<400> 10  
Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly  
1 5

65 <210> 11  
<211> 16



## ES 2 267 510 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebadores de adaptador sintético

<400> 16

aattggata gacctcaggc ctctggtgtg tatatgggta atcttacggc ccag

54

10

<210> 17

<211> 54

<212> ADN

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebadores de adaptador sintético

20

<400> 17

aattctggga agtaagatta cccatataca caccagaggc ctgaggtctc tcca

54

25

30

35

40

45

50

55

60

65