



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 348**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 33/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00402562 .3**

96 Fecha de presentación : **15.09.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1188446**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

54 Título: **Vectores proteínicos para el suministro de moléculas a las células que expresan CD11b.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.12.2009**

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR  
25-28, rue du Docteur Roux  
75724 Paris Cédex 15, FR  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

72 Inventor/es: **Leclerc, Claude;  
Guermontprez, Pierre;  
Ladant, Daniel;  
Guiso, Nicole y  
Khelef, Nadia**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

## DESCRIPCIÓN

Vectores proteínicos para el suministro de moléculas a las células que expresan CD11b.

## 5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a una nueva utilización de una toxina adenilciclase de *Bordetella* en la preparación de vectores para dirigir *in vivo* una molécula de interés, específicamente a las células que expresan CD11b. La invención se refiere asimismo a una composición inmunogénica que inicia las respuestas inmunes a las composiciones farmacéuticas y a un nuevo vector proteínico para el suministro de moléculas a células que expresan CD11b.

*Bordetella pertussis*, el agente que provoca la tosferina, secreta diversas toxinas que incluyen la bien conocida toxina *pertussis* (PT) y la toxina adenilato ciclase (CyaA) o también adenilciclase. La CyaA es un factor crítico de virulencia de *B. pertussis* en el modelo respiratorio murino, que es necesario para las etapas tempranas de la colonización pulmonar. En verdad, la delección genética de esta toxina aumenta de forma importante los efectos patológicos de la infección por *B. pertussis*, reduciendo el número de bacterias que se recuperan a partir de los pulmones y aboliendo casi el reclutamiento de las células inflamatorias, y las lesiones pulmonares que se observan después de la infección [Weiss *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1989; Gross *et al.*, 1992; Khelef *et al.*, 1992; Khelef *et al.*, 1994; Gueirard *et al.*, 1998]. Además, CyaA es un antígeno que protege contra la infección por *B. pertussis* en el modelo respiratorio murino [Guso *et al.*, 1989; Guiso *et al.*, 1991].

Descubierta originariamente por Hewlett *et al* en los sobrenadantes del cultivo de *B. pertussis* [Hewlett *et al.*, 1976], se encontró posteriormente que la adenilato ciclase era activada por la calmodulina eucariótica [Wolff *et al.*, 1980]. Esta sorprendente característica encontró rápidamente una explicación racional cuando se mostró por Confer y Eaton que la adenilato ciclase podía penetrar en las células eucarióticas en las que, después de activación por la calmodulina, podía provocar un gran aumento en el AMPc en el interior de estas células diana [Confer *et al.*, 1982].

La adenilato ciclase es codificada por el gen *cyaA*, y su expresión, como la de otros genes de virulencia de *B. pertussis* está regulada coordinadamente por señales ambientales. El gen *cyaA* forma parte de un operón que también contiene genes *cya B*, *D* y *E*, que son necesarios para la secreción de CyaA [Ladant *et al.*, 1999]

La toxina CyaA constituye una proteína bifuncional de 1706 residuos que consiste en un dominio catalítico N-terminal de 400 aminoácidos y una parte C-terminal de 1306 residuos que es responsable de la unión de la toxina a la membrana de la célula diana y del subsiguiente suministro de la mitad catalítica al citosol celular [Sakamoto *et al.*, 1992] [Ladant *et al.*, 1999]. Esta parte muestra también una débil actividad hemolítica, debido a su capacidad para formar canales catiónico-selectivos en las membranas biológicas [Benz *et al.*, 1994] [Gray *et al.*, 1998]. Esta región es homóloga a la hemolisina de *Escherichia coli* y a otros miembros de la familia RTX (Repetición en ToXina) de las toxinas bacterianas. En particular, contiene una serie de repeticiones nonapeptídicas ricas en aspartato y glicina que están implicadas en la unión del calcio [Rose *et al.*, 1995] [Coote *et al.*, 1992].

El polipéptido CyaA se sintetiza como una protoxina inactiva que se convierte en una toxina activa mediante palmitoilación postraducciona de dos lisinas internas (lisinas 856 y 963). Esta modificación necesita el producto de un gen accesorio, *cyaC*, que se localiza cerca de *cyaA* en el cromosoma de *B. pertussis*.

Se ha mostrado que CyaA se une a, e invade, diversos tipos celulares que incluyen células en las que está ausente el tráfico de la membrana, tal como en los eritrocitos de mamíferos [Rogel *et al.*, 1992]. Esto sugirió que el dominio catalítico de CyaA está directamente translocado a través de la membrana plasmática de las células diana. La internalización del dominio catalítico en el citosol celular, depende del calcio, de la temperatura y del potencial de la membrana plasmática [Rogel *et al.*, 1992] [Karimova *et al.*, 1998] [Otero *et al.*, 1995]. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales la toxina transporta su dominio catalítico N-terminal a través de la membrana permanece ampliamente desconocido hasta la fecha. Además, no se ha informado de ningún receptor específico con respecto a la unión para CyaA.

Las consecuencias fisiológicas de la intoxicación celular por CyaA se caracterizaron *in vitro* en los fagocitos. Confer y Eaton demostraron inicialmente que AC extraído de *B. pertussis* aumenta el nivel intracelular de AMPc en los neutrófilos o en los macrófagos, lo que conduce a la inhibición de la quimiotaxis ya funciones bactericidas tales como la generación de superóxido y capacidades fagocíticas [Confer *et al.*, 1982]. Estas actividades se confirmaron posteriormente con toxinas purificadas o con mutantes bacterianos en los que CyaA se había suprimido genéticamente [Pearson *et al.*, 1987; Friedman *et al.*, 1987] [Njamkepo *et al.*, 2000]. Por el contrario, y a pesar de cambios significativos en su contenido en AMPc, la viabilidad de las progenies celulares de origen no hematopoyético parecieron no estar afectadas por la intoxicación de CyaA [Bassinet *et al.*, 2000]. Además, se demostró previamente que la CyaA de *B. pertussis* puede disparar la apoptosis *in vitro* [Khelef *et al.*, 1993; Khelef *et al.*, 1995] e *in vivo* [Gueirard *et al.*, 1998]. En estos modelos, la delección genética de CyaA abolió la apoptosis de los macrófagos, pero no la muerte de los neutrófilos, sugiriendo que CyaA i) es responsable principalmente de la apoptosis macrofágica, ii) podría ser responsable de la apoptosis neutrofílica, pero que otro factor puede ser asimismo responsable. Además de esto, estudios *in vivo* llevados a cabo en un modelo murino de infección por *B. bronchiseptica* (el homólogo animal de *B. pertussis*, cuya CyaA está estrechamente relacionada), demuestran que la diana principal de la toxicidad CyaA de *B. bronchiseptica* es una población GM-CSF dependiente y sensible a la ciclofosfamida que controla las etapas tempranas de la infección

(Harvill *et al.*, 1999]. Estos criterios identificaron neutrófilos y posiblemente otras células incluyendo macrófagos células dendríticas. Estas poblaciones de células diana para CyaA son las mismas que limitan las etapas tempranas de la infección y favorecen el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que controla las últimas etapas de la infección [Harvill *et al.*, 1999].

De modo distinto a otras toxinas, CyaA se ha considerado durante un largo tiempo como independiente de cualquier unión a los receptores. Esto se basa en las observaciones de que i) CyaA puede intoxicar una amplia variedad de progenies celulares modélicas de origen vario [Ladant *et al.*, 1999], ii) CyaA se une a las células Jurkat y a los hematíes de oveja de una forma no saturable [Gray *et al.*, 1999]. Sin embargo, se ha descubierto alguna especificidad con respecto a las células infectadas por CyaA. De hecho, estudios *in vivo* mostraron que durante la infección respiratoria murina con especies de *Bordetella*, CyaA destruyó específicamente leucocitos (especialmente (especialmente macrófagos) sin dañar de forma importante las células epiteliales [Gueirard *et al.*, 1998; Harvill *et al.*, 1999].

En la solicitud de patente WO 93/21324 se ha propuesto utilizar la adenilciclase recombinante de *Bordetella* para inducir una respuesta de las células CD4<sup>+</sup> T o CD8<sup>+</sup> T; sin embargo, ya que no se identificaron receptores específicos para la adenilciclase de *Bordetella*, no se pudo saber si la presentación antigénica se relacionó con la absorción por las células presentadoras antigénicas no profesionales, seguido por sensibilización cruzada y presentación mediante las células dendríticas, o si el antígeno hizo diana en las Células Presentadoras Antigénicas profesionales (pAPC).

En línea con su fenotipo superficial, APC y más específicamente, las células dendríticas (expresión intensa de MHC I y II, moléculas coestimuladoras y adhesivas), representan las APC más potentes en muchos de los ensayos *in vitro* para la sensibilización de células T que no habían sido tratadas anteriormente [Bell *et al.*, 1999; Viola *et al.*, 1999]. Otras APC como las células B nativas restantes, por ejemplo, podrían incluso ser tolerogénicas, ya que la inyección de las células B masculinas restantes en los huéspedes femeninos conduce a la tolerización específica de las células CD8<sup>+</sup> T masculino-específicas [Fuchs *et al.*, 1992]. *In vitro*, las células B nativas, podrían suprimir las células CD8<sup>+</sup> T nativas mediante un mecanismo dependiente de Fas (Bennett *et al.*, 1998).

Además, la presentación de Ag mediante las células dendríticas se correlaciona *in vivo* con la inducción de las respuestas de las células T. Esto se ha establecido para la presentación de Ag limitada a MHCII. La inyección de Ag sin adyuvantes mediante la vía intravenosa (iv) no induce habitualmente la sensibilización de las células T [Kyburz *et al.*, 1993; Aichele *et al.*, 1994; Aichele *et al.*, 1995] y conduce a la presentación de Ag mediante las células B no específicas [Guery *et al.*, 1997] [Zhong *et al.*, 1997; Reis e Sousa *et al.*, 1999] y, eventualmente, las células dendríticas [Crowley *et al.*, 1990] [Zhong *et al.*, 1997; Reis e Sousa *et al.*, 1999]. Contrariamente a esto, las estrategias de inmunización local como la inmunización subcutánea (sb), habitualmente en presencia de un adyuvante, induce la sensibilización de las células T y dirige la presentación de Ag por las células de Langerhans que migran desde la piel al LN, drenando el sitio de inmunización. En este caso, las células B y los macrófagos no están implicados [Guery *et al.*, 1996]. Resultados similares se obtuvieron después de la inmunización sc o intradérmica (id) del ADN para los complejos peptídicos MHCII y MHCI: las células dendríticas pueden transfectarse directamente al sitio local de la inyección y migrar entonces al LN aferente vía los linfáticos eferentes [Condon *et al.*, 1996; Casares *et al.*, 1997; Porgador *et al.*, 1998]. Es conocido que la migración constituye un evento clave de la inmunidad, ya que la interrupción mecánica de los linfáticos aferentes abroga la respuesta de las células T a los sensibilizadores dérmicos o a los injertos de piel [Zinkernagel *et al.*, 1997].

Por tanto, el direccionamiento a las células dendríticas es esencial para la estimulación de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Ya que la mayoría de las respuestas de los anticuerpos dependen del auxilio de las células CD4<sup>+</sup> T, dirigir los antígenos a las células dendríticas constituye el principal objetivo en las vacunaciones.

Los solicitantes han estado interesados en estudiar la presentación de la adenilciclase de las especies de *Bordetella* por las células T, e identificaron una molécula receptora específica que se encuentra en las células específicas, que interacciona con CyaA y abre nuevas posibilidades para la utilización de CyaA como un vector proteínico para moléculas de interés.

Las toxinas bacterianas genéticamente detoxificadas representan candidatos como vectores vacunales, en particular para el epítipo de T, debido a su capacidad para invadir las células eucarióticas (Ladant *et al.*, 1999). Sin embargo, se mostró que algunos vectores proteínicos sensibilizaban las expuestas CTL *in vivo* (Baillard *et al.*, 1996, Cabonette *et al.*, 1999). Además, a pesar de los numerosos y prometedores estudios *in vitro*, no se mostró ningún vector que pudiera direccionar exclusivamente en pAPC y más particularmente, en las células dendríticas mieloides.

Se ha demostrado a continuación que, mediante los vectores de la presente invención, se podría hacer diana en otras células, especialmente neutrófilos.

La invención proporciona medios que -por lo menos en parte- pueden cumplir con estos requerimientos, y propone nuevos vectores que harían posible que moléculas hicieran específicamente en determinadas poblaciones, por ejemplo, de pAPC, y que fueran capaces de estimular la respuesta inmune.

Además, la molécula dirigida a pAPC y los leucocitos específicos harían posible la preparación de nuevos vectores útiles para suministrar moléculas biológicamente activas al entorno próximo de estas células. Estas moléculas, por ejemplo, podrían modular las propiedades funcionales de las células en las que se hubiera hecho diana, o de las implicadas en la respuesta inmune o en la respuesta inflamatoria.

De hecho se descubrió que la toxina adenilciclase de *Bordetella pertussis* se une específicamente con un receptor celular denominado  $(CD11b/CD18)\alpha_M/\beta_2$  y que esta interacción se requiere para el suministro intracelular del dominio de la adenilciclase al citosol celular y subsiguiente pala muerte de la célula. La integrina  $(CD11b/CD18)\alpha_M/\beta_2$  es un dímero de la familia de las integrinas  $\beta_2$ , estando limitada la expresión de estas integrinas a los leucocitos.  $CD11b/CD18$   $\alpha_M/\beta_2$  muestra un patrón de expresión en el ratón y en el hombre, que se limita a neutrófilos/granulocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK y subconjuntos de linfocitos B y T  $CD8^+$  (Jeyaseelan *et al.*, 2000, Arnaout *et al.*, 1990).

Por tanto, este receptor representaría una diana ideal para nuevos vectores, diseñados en particular para la inmunización del epítipo de T.

Se ha demostrado en la presente invención que la adenilciclase de *Bordetella* puede utilizarse para que una molécula haga diana *in vivo*, específicamente en las células que expresan  $CD11b$ .

En una forma de realización específica, dicha respuesta se obtiene evitando el requerimiento del adyuvante y el auxilio de las células  $CD4^+$  T.

La presente invención proporciona, por lo tanto, una nueva composición inmunogénica eficiente, así como también un nuevo vector de suministro de medicamentos a las células que expresan  $CD11b$ .

## 20 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de la adenilciclase de *Bordetella* en la preparación de un vector proteínico para que una molécula de interés haga diana específicamente en las células que expresan  $CD11b$ .

El vector proteínico de la invención comprende una forma no tóxica de la adenilciclase de una especie de *Bordetella* y un antígeno o epítipo que se acopla químicamente a dicha adenilciclase de una especie de *Bordetella*, en la que dicho epítipo antigénico se acopla a un único residuo de cisteína que se inserta genéticamente, localizado en el interior del dominio catalítico de dicha adenilciclase.

La solicitud describe la utilización de una toxina adenilciclase de *Bordetella* en la que dicha adenilciclase se recombina con un antígeno de interés, o se conjuga con una molécula de interés para la preparación de una composición para que dicho péptido o molécula haga diana específicamente en las células que expresan  $CD11b$ .

El término “específicamente” significa, en el contexto de la presente invención, que la adenilciclase, cuanto se utiliza como un vector para una molécula de interés, se dirige preferentemente a las células que expresan  $CD11b$ , ofreciendo medios, por lo tanto, para dirigir la molécula de interés a la superficie de dichas células o al interior de éstas de una forma selectiva con respecto a otras células.

En una forma de realización de la invención, la molécula de interés se dirige esencialmente a las células que expresan  $CD11b$ .

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “células que expresan  $CD11b$ ” se refiere a las células que expresan el receptor  $CD11b/CD18 \alpha_M/\beta_2$  en su superficie. En particular, en el ratón, estas células son granulocitos/neutrófilos, macrófagos, células NK, subconjuntos de células T  $CD8^+$  y B, y células dendríticas mieloides.

Ya que las células que expresan  $CD11b$ , y más específicamente las células dendríticas mieloides, los neutrófilos y los macrófagos, están implicados en funciones esenciales del sistema inmune e innato de defensa, en particular en las respuestas inflamatorias e inmunes específicas, la invención se refiere a la preparación de un vector proteínico o de una composición capaz de dirigir una molécula o un péptido de interés a estas células que expresan  $CD11b$ .

En particular, en una forma de realización, la diana es efectiva *in vivo* para dicha molécula o péptido.

La invención proporciona, por lo tanto, unos medios apropiados para el diseño de composiciones apropiadas para la administración a los huéspedes animales o humanos que requieran dirigir ciertos leucocitos y en particular, células dendríticas mieloides, neutrófilos o macrófagos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “adenilciclase de *Bordetella*” se refiere a la adenilato ciclase dependiente de la calmodulina, o fragmentos suyo, que se secreta (n) en las especies de *Bordetella*, conservando dicho fragmento las propiedades funcionales de la adenilciclase, un factor principal preceptivo de virulencia para las etapas iniciales de la colonización bacteriana pulmonar. La adenilato ciclase se sintetiza y secreta en forma de un polipéptido de 1706 aminoácidos; la actividad catalítica dependiente de la calmodulina se localiza en los primeros 400 aminoácidos. Para ser activa, dicha toxina adenilciclase se vuelve invasiva y hemolítica cuando se modifica postraduccionalmente por el producto del gen *CyaC*, coexpresión del producto del gen *cyaC*.

Las siguientes características específicas de la toxina adenilciclase de *Bordetella* indican que esta toxina puede utilizarse en la preparación de un vector proteínico para dirigir *in vivo* una molécula de interés a las células que expresan  $CD11b$ .

- a) esta adenilato ciclasa se une específicamente a las células que expresan CD11b.
- b) el dominio catalítico N-terminal se transloca al citosol de estas células que expresan CD11b.
- 5 c) el dominio C-terminal se une a la membrana de las células que expresan Cd11b y podría internalizarse mediante una vía endocítica.

Debido a la interacción específica entre la toxina adenilciclase de *Bordetella* y el receptor CD11b/CD18  $\alpha_m/\beta_2$ , la molécula de interés se dirige específicamente, por lo menos, a la superficie de las células que expresan CD11b. En una forma de realización particular de la invención, la toxina adenilciclase de *Bordetella* se utiliza en la preparación de un vector proteínico para suministrar la molécula de interés al citosol de las células que expresan CD11b, en la superficie o en la vía endocítica.

Los vectores de expresión para la preparación de la adenilciclase recombinante de *Bordetella*, se describen en la solicitud de patente WO 93/21324 (Institut Pasteur). Más específicamente, los vectores de expresión pueden construirse dirigiendo la expresión tanto del gen *cyaA*, como del gen *cyaC* (Sebo *et al.*, 1991). Paralelamente, puede construirse un plásmido secundario que transporta genes necesarios para la secreción de la adenilciclase citotóxica en *E. coli*, tales como *hlyB* y *hlyD*, tal como se describe, por ejemplo, en Meckman *et al.*, 1985. En particular, puede utilizarse el plásmido de expresión pCACT3, que se describe en WO 93/21324. Utilizando este plásmido, la adenilciclase puede expresarse en *E. coli* y posiblemente secretarse por esta bacteria en grandes cantidades. Asimismo, se purifica fácilmente, por ejemplo, utilizando cromatografía de afinidad sobre resina CaM Affi-Gel u otros procedimientos publicados, como los que utilizan DEAE-sepharosa y fenil-sepharosa.

En una forma de realización de la invención, la adenilciclase es una adenilciclase recombinante modificada genéticamente. En particular, mutaciones tales como las puntuales, las deleciones o las inserciones, pueden obtenerse utilizando técnicas de mutagénesis al azar o dirigidas habitual y puntualmente, siempre que sean todavía funcionales los dominios necesarios para la unión a las células que expresan CD11b, y, opcionalmente, para la translocación en el citosol. Los ensayos para evaluar la unión específica de una toxina recombinante a las células que expresan CD11b y la subsiguiente translocación del dominio catalítico, se describen en la parte experimental siguiente.

En otra forma de realización de la invención, la adenilciclase recombinante de la especie *Bordetella*, comprende el fragmento de la adenilciclase de la especie nativa de *Bordetella*, en la que dicho fragmento puede unirse al receptor de CD11B.

Más específicamente, la unión específica a CD11b puede evaluarse *in vitro* con anticuerpos monoclonales anti-CD11b, tal como se ilustra en los ejemplos.

Para utilizarse en la preparación del vector proteínico o en la preparación de una composición, la adenilciclase es preferentemente no tóxica. Los mutantes no tóxicos de la toxina adenilciclase son bien descritos en la técnica (Betsou *et al.* Infect. Immun. Sep 1993, 6(9) 3583-3589; Beteou *et al.* Infect. Immun. Sept 1995, 63(9) 3309-3315).

En una forma de realización preferida de la presente invención, la adenilciclase se aísla a partir de *Bordetella pertussis*.

La molécula de interés que se describe en la solicitud, es seleccionada de entre el grupo constituido por: lipopéptidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias químicas.

Según una forma de realización específica, una molécula de interés es un antígeno heterólogo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “heterólogo” se refiere a un antígeno que se deriva del antígeno de una especie distinta que la de la adenilciclase que se utiliza en el vector.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sitio optativo” se refiere a un sitio en el que el péptido heterólogo puede insertarse sin afectar sustancialmente a las propiedades funcionales deseadas de la toxina adenilato ciclasa, es decir, sin que afecte a los dominios necesarios para la unión específica al receptor CD11b/CD18 y sin que afecte ventajosamente al proceso de translocación del dominio catalítico. En una forma de realización preferida, la capacidad de la toxina CyaA para promover la síntesis de AMP en las células diana, se conserva posteriormente.

Los procedimientos para seleccionar los sitios optativos, se presentan, por ejemplo, en la patente WO93/21324 y en Ladant *et al.*, 1992. En particular, una metodología que utiliza una doble selección (resistencia a un antibiótico y ensayo colorimétrico sobre las placas mediante  $\alpha$ -complementación), permite identificar fácilmente inserciones oligonucleótidas (que conservan el marco de lectura) en la parte del gen que codifica el dominio catalítico N-terminal de la toxina. Las consecuencias funcionales de estas mutaciones sobre la actividad catalítica de la toxina, pueden analizarse fácilmente, tanto genéticamente (complementación funcional de una cepa *cya* de *E. coli* o bioquímicamente (caracterización de la estabilidad de las adenilciclasas modificadas, de su actividad enzimática, o de su interacción con CaM, etc.). Esta metodología ha permitido se rastrear a un gran número de mutaciones para identificar los sitios que son potencialmente ventajosos para la inserción de los determinantes antigénicos.

## ES 2 331 348 T3

En las formas de realización específicas, se selecciona un sitio optativo a partir del grupo formado por los residuos 137-138, residuos 224-225, residuos 228-229, residuos 235-236 y residuos 317-318 de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*.

5 Sin embargo, pueden utilizarse otros sitios optativos, que pueden identificarse utilizando la metodología anteriormente indicada, especialmente los sitios entre 400 y 1.700.

10 En una forma de realización preferida de la invención, el epítipo o antígeno que se acopla químicamente a la adenilciclase del vector proteínico de la invención o la composición, se diseña específicamente para iniciar la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (respuesta CTL), la cual sigue a la consecución de la diana de la adenilciclase acoplada químicamente con un antígeno o epítipo para las células que expresan CD11b, seguido por la translocación del antígeno o epítipo al citosol de dichas células que expresan CD11b, y en particular a las células dendríticas mieloides.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “epítipo” se refiere a un péptido heterólogo que puede inducir una respuesta inmune.

20 En las formas de realización específicas, el antígeno se selecciona de entre el grupo constituido por un antígeno bacteriano intracelular, un antígeno celular tumoral, un antígeno vírico, un antígeno fúngico o un antígeno celular parasitario.

25 En una forma de realización preferida de la invención, el epítipo o antígeno químicamente acoplado con la adenilciclase del vector proteínico de la invención o la composición, se diseña específicamente para iniciar la respuesta de las células CD4<sup>+</sup> (respuesta CTL), la cual sigue a la diana de la adenilciclase con el antígeno o epítipo para las células que expresan CD11b, seguido por la translocación del antígeno o epítipo al citosol de dichas células que expresan CD11b, y en particular a las células dendríticas mieloides.

30 Una molécula de interés puede ser especialmente un antígeno seleccionado de entre el grupo constituido por: un antígeno poliovírico, un antígeno del virus HIV, un antígeno del virus de la influenza, un epítipo del virus de la coriomeningitis.

35 Las propiedades funcionales de las células que expresan CD11b definen además una nueva utilización de la toxina adenilciclase de *Bordetella* para la preparación de un vector proteínico para dirigir medicamentos a estas células específicas. En el contexto de la invención, en una forma de realización específica de la invención, la molécula así denominada de interés es un medicamento, el cual puede acoplarse químicamente a la adenilciclase. El procedimiento para acoplar un medicamento a un polipéptido es bien conocido en la técnica y comprende, por ejemplo, sulfhidrilo activado por unión disulfuro wng N-pgrd sulfonilo.

40 Por primera vez, en la parte experimental de este texto se muestra que una inserción genética de un antígeno en una forma detoxificada de la toxina adenilciclase de *Bordetella* permite que haga diana *in vivo* en el citosol de las células CD11b<sup>+</sup> presentadoras de antígenos.

45 Más específicamente, la presentación antigénica para la sensibilización selectiva de las células citotóxicas CD8<sup>+</sup>, se lleva a cabo principalmente mediante las células dendríticas mieloides.

50 Los solicitantes han mostrado también que (la respuesta) CTL específica para el antígeno vectorizado puede iniciarse *in vivo* después de una inyección intravenosa única de la toxina recombinante, especialmente cuando no es necesario proporcionar un adyuvante heterólogo. Estos resultados muestran en la parte experimental y en particular que la diana específica del epítipo en las células dendríticas mieloides permite nuevas estrategias de inmunización que evitan la necesidad del adyuvante y el auxilio de las células CD4<sup>+</sup> T.

55 La invención se refiere además a una composición farmacéutica para administrar a un hombre o a un animal, (que está) formulada para hacer que una molécula de interés haga diana específicamente en las células que expresan CD11b, caracterizada porque dicha molécula de interés se acopla químicamente a una adenilciclase de la especie *Bordetella*.

La molécula de interés que se describe en la solicitud es seleccionada de entre un grupo constituido por lipopéptidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias químicas.

60 Según la invención, la molécula de interés es un antígeno o un epítipo.

En las formas de realización específicas, la adenilciclase es una toxina de *Bordetella pertussis*.

65 En otras formas de realización específicas, la toxina adenilciclase es una toxina recombinante genéticamente modificada de *Bordetella pertussis*. En una forma de realización preferida, la adenilciclase es una adenilciclase no tóxica, especialmente una adenilciclase detoxificada.

En una forma de realización preferida, la adenilciclase modificada genéticamente conserva la capacidad para translocar la molécula de interés, específicamente en el citosol de las células que expresan CD11b.

En una forma de realización específica, el antígeno es uno celular bacteriano intracelular, un antígeno celular tumoral, un antígeno vírico, un antígeno fúngico o un antígeno celular parasitario.

En las formas de realización preferidas, una molécula de interés p es un antígeno seleccionado de entre el grupo constituido por: un epítipo poliovírico, un virus HIV, un antígeno del virus de la influenza, un epítipo del virus de la coriomeningitis.

En otra forma de realización, la toxina modificada genéticamente conserva la capacidad para suministrar la molécula de interés específicamente en la superficie de las células que expresan CD11b o en la vía endocítica.

Los solicitantes han mostrado que la administración intravenosa *in vivo* de la composición inmunogénica en un huésped animal o humano, tal como se define en la presente invención, sin adyuvantes, es suficiente para promover eficientemente una respuesta inmune en dicho huésped animal o humano.

Como consecuencia, en una forma de realización específica, la composición inmunogénica o farmacéutica es desprovista de adyuvantes sensibilizantes que se utilizan habitualmente en la técnica, tal como el hidróxido de aluminio.

Además, la invención se refiere también a la utilización de la composición inmunogénica tal como se define anteriormente, para la preparación de una vacuna o de una composición inmunoterapéutica, para la administración a un huésped animal o humano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “composición inmunoterapéutica” se refiere a una composición que conduce a una respuesta inmunológica y que se asocia con tratamientos terapéuticos, tales como el tratamiento contra cánceres, infecciones víricas, infecciones parasitarias o infecciones bacterianas.

La solicitud describe asimismo un procedimiento para inmunizar a un huésped animal o humano, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- a) proporcionar una composición inmunogénica tal como se ha definido anteriormente;
- b) administrar dicha composición inmunogénica *mediante* una vía intravenosa a dicho huésped, para promover una respuesta inmune.

La invención se refiere finalmente a un vector proteínico para el suministro de un antígeno o epítipo, específicamente a las células que expresan CD11b, caracterizada porque dicho vector comprende una adenilciclase de la especie *Bordetella* que se acopla químicamente a dicho antígeno o epítipo.

El vector proteínico puede dirigir el antígeno o epítipo a las células que expresan CD11b mediante la unión específica de la adenilciclase de *Bordetella* con CD11b/CD18  $\alpha_m\beta_2$  que se encuentra en la superficie de las células específicas. En una forma de realización específica, el vector puede también suministrar específicamente el antígeno o epítipo al citosol de las células que expresan CD11b.

En las formas de realización específicas, el vector proteínico puede dirigir un antígeno o epítipo a células dendríticas mieloides o a neutrófilos.

El antígeno o epítipo se acopla químicamente a la toxina adenilciclase. El procedimiento para acoplar una molécula a un polipéptido conicod en la técnica. Como ejemplo, se ha demostrado que un derivado de la biotina, biotín HDPD, puede acoplarse selectivamente a un único residuo de cisteína que se inserta genéticamente en el interior del dominio catalítico. Los péptidos sintéticos se han acoplado de forma similar a la toxina adenilato ciclase que contiene cisteína.

En una forma de realización específica, el vector proteínico comprende una adenilciclase modificada genéticamente. en una forma de realización preferida, la adenilciclase es una adenilciclase no tóxica recombinante procedente de *Bordetella pertussis*.

Los ejemplos siguientes ilustrarán la presente invención. Más específicamente, en la parte A, se muestran datos experimentales que revelan la unión específica de la toxina adenilciclase al receptor CD11b/CD18, y en particular, la unión específica de la toxina adenilciclase a las células que expresan CD11b *in vitro*. En la parte B, los resultados experimentales muestran la posibilidad de dirigir un antígeno *in vitro* e *in vivo*, específicamente, al citosol de las células que expresan CD11b, y en particular, a las células dendríticas mieloides. Además, los resultados muestran que alcanzar (esta) diana es mediado por el receptor CD11b y que se observa la sensibilización de CTL después de la inmunización sistémica en ausencia del adyuvante.

Finalmente, los resultados indican que, a diferencia de muchas otras respuestas CTL, como las producidas contra el antígeno de sensibilización cruzada, el auxilio de las células CD4<sup>+</sup> T no fue preceptivo para la sensibilización de las respuestas CTL.

**Leyenda de las figuras**

## Figura 1

5 *La unión saturable de CyaA se correlaciona con la expresión de CD11b*

a: La unión de CyaA a la superficie de los macrófagos (J774A.1), células B (LB27.4) y células T (EL4), se llevó a cabo a 37°C durante 20 minutos. La unión de CyaA a la superficie, se detectó mediante un anticuerpo policlonal anti-CyaA biotinilado, revelado mediante estreptavidina-PE y que se detectó mediante citometría de flujo en las células vivientes, tal como se describe en la sección de materiales y procedimientos. La unión se expresa como  $\Delta\text{MFI}$  = (valor medio de la intensidad de fluorescencia de las células incubadas con CyaA)-(intensidad media de la fluorescencia de las células sin CyaA).

b,c,d,e.: Expresión superficial de las integrinas  $\beta_2$  sobre las células (J774A.1, LB27.4 y EL4. La expresión de CD11a (b), CD11b (c), CD11c (d) y CD18 (e) se determinó mediante citometría de flujo utilizando mAbs específicos acoplados a PE. La expresión de la integrina se expresa como  $\Delta\text{MFI}$  = (valor medio de la intensidad m de fluorescencia de las células teñidas con mAb específico)-(intensidad media de fluorescencia de las células teñidas con un isótopo de control mAb).

## 20 Figura 2

*La unión de CyaA a progenies celulares murinas es bloqueada por anti-CD11 b mAb*

Se preincubaron células a 4°C durante 15 minutos con o sin 20  $\mu\text{g/ml}$  de mAbs específicos, incubándose entonces a 4°C durante 20 minutos con 5  $\mu\text{g/ml}$  de CyaA y con 10  $\mu\text{g/ml}$  de mAbs específicos si estaban presentes durante la preincubación. El CyaA unido a la superficie se detectó con un anticuerpo policlonal anti-CyaA biotinilado, que se reveló mediante estreptavidina-PE y que se detectó mediante citometría de flujo sobre las células vivas, tal como se describe en la sección de materiales y procedimientos.

a, b: Efecto del M1/70 anti-CD11b mAb en la unión de varias dosis de CyaA. Células dendríticas FSDC (a) o macrófagos J774A.1 (b) se preincubaron sólo con medio (○) o con M1/70 anti-CD11b mAb (●), incubándose entonces con CyaA con o sin M1/70 anti-CD11b mAb. Se determinó  $B_{\text{max}}$  fijando puntos experimentales obtenidos de experimentos llevados a cabo sin mAbs para  $\Delta\text{MFI} = B_{\text{max}} * [\text{CyaA}] / (K_d + [\text{CyaA}])$ . La unión de CyaA se representa en gráficas como un porcentaje de  $B_{\text{max}}$  con respecto a la concentración de CyaA.

c, d: Efecto de mAbs específicos sobre una dosis fijada de la unión de CyaA. Células FSDC (c) o J774A.1 (d) se preincubaron con o sin mAbs específicos (anti-CD11a, 2D7, antiCD11b, M1/70 y 5C6, anti-CD11C, HL3, anti-CD18, C17/16, A95-1) de control) y se incubaron con CyaA a la concentración fijada de 5  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores de  $\Delta\text{MFI}$  obtenidos para la unión de CyaA en las células tratadas con mAbs específicos se normalizaron como valores  $\Delta\text{MFI}$  obtenidos para la unión de CyaA sin mAb.

## Figura 3

*Unión de CyaA a los neutrófilos humanos es bloqueada por anti-CD11b y anti-CD18 mAbs*

a, b, c: Se preincubaron histogramas de fluorescencia de neutrófilos recién purificados con sólo medio (a), con el anti-CD11b mAb 44 (b) o con un mAb de control del ratón emparejado isotópicamente (c), incubándose entonces con (gris) o sn (blanco) CyaA biotinilado, y revelándose mediante estreptavidina-PE. El número de células se representó en gráficas con respecto al log de la fluorescencia PE.

d: Efecto de mAbs específicos sobre la unión de CyaA a los neutrófilos (anti-CD11b, 44, M1/70, anti-CD18, TS/18, IgG2a de control de ratón, IgG2b de control de rata, A95-1). Los neutrófilos recién purificados se preincubaron con o sin mAbs específicos y se incubaron con CyaA. Los valores de  $\Delta\text{MFI}$  obtenidos para la unión de CyaA en las células tratadas con mAbs específicos se normalizaron como un porcentaje de los valores  $\Delta\text{MFI}$  obtenidos para la unión de CyaA sin mAb.

## Figura 4

60 *El aumento del AMPc intracelular y la muerte celular mediada por CyaA están bloqueados específicamente por un anti-CD11b mAb en las células J774A.1*

a: Efecto de mAbs específicos sobre la acumulación de AMPc intracelular. Las células J774A.1 se preincubaron a 4°C durante 1 hora con o sin 10  $\mu\text{g/ml}$  de mAbs específicos (anti-CD11b, M1/70, anti-CD18, C17/16) y se incubaron entonces a 37°C durante 20 minutos con 5  $\mu\text{g/ml}$  de CyaA y con 10  $\mu\text{g/ml}$  de mAbs si estaban presentes durante la preincubación. Se determinó el contenido intracelular de AMPc tal como se describe en la sección de materiales y procedimientos.



- b: Efecto de Mabs específicos sobre la muerte celular mediada por CyaA. Las células J774A.1 se preincubaron a 4°C durante 1 hora con sólo medio o con 10 µg/ml de mAbs específicos (anti-CD11a, 2D7 anti-CD11b, M1/70, anti-CD11c, H13, anti-CD18, C71/16, control, 2.4G2). Se incubaron entonces a 37°C durante 2 horas con 0,5 µg/ml de CyaA y con 10 µg/ml de mAbs específicos si estaban presentes durante la preincubación. Se determinó la lisis celular mediante la liberación de LDH utilizando el ensayo Cytotox 96<sup>TM</sup>.

Figura 5

- 10 *Células CHO se unen a CyaA y se vuelven sensibles a CyaA cuando se transfectan con CD11b, pero no con CD11c*

a, b: Unión de CyaA a la superficie de los transfectantes CHO. Las células CHO transfectadas con CD11b/CD18 humanas (●), CD11c/CD18 humanas (○) o transfectadas simuladamente (►), se incubaron con diversas dosis de CyaA durante 20 minutos a 37°C (a) o 4°C (b). CyaA unido a la superficie se detectó con un anticuerpo policlonal anti-CyaA biotinilado, se reveló mediante estreptavidina-PE y se detectó mediante citometría de flujo en las células vivas, tal como se describe en la sección de Material y Métodos. La unión se expresa como ΔMFI= valor medio de la intensidad de fluorescencia de las células incubadas con CyaA)-(intensidad media de fluorescencia de las células sin CyaA).

- 20 c: Acumulación intracelular de AMPc en las transfectantes CHO.

Las células CHO transfectadas con CD11b/CD18 humanas (●), CD11c/CD18 (○) o transfectadas simuladamente (►), se incubaron con o sin CyaA durante 20 minutos a 37°C. Se determinó el contenido de AMPc intracelular tal como se describe en la sección de materiales y procedimientos.

- 25 d: Lisis celular en las transfectantes CHO. Las células CHO transfectadas con las CD11b/CD18 humanas, las CD11c/CD18 humanas o las transfectadas simuladamente se incubaron con 5 g/ml de CyaA durante 4 horas a 37°C. La lisis celular se determinó mediante la liberación de LDH utilizando el ensayo Cytotox 96<sup>TM</sup>.

Figura 6

*Inmunización intravenosa con CyaAOVA inicia las respuestas anti-OVA CTL de una forma independiente en CD4, en CD40 y en las células B*

- 35 Ratones C57BL/6 WT +/+ (a), CD4-/- (b) CD40-/- (c) o IgM-/- (d), se inmunizaron intravenosamente con 50 µg de CyaAOVA, una forma genéticamente detoxificada de CyaA que transporta el epítipo H-2K<sup>b</sup> limitado SIINFEEKL DE OVA (●, ○) o con CyaAE5, una toxina de control detoxificada sin el epítipo OVA (▲, Δ). Siete días después, se sacrificaron los animales y los esplenocitos se volvieron a estimular *in vitro* durante 5 días con 10 µg/ml del péptido sintético pOVA en presencia de esplenocitos C57BL/6 irradiados. La actividad CTL se evaluó en un ensayo de 4 horas de duración, de liberación del cromó<sup>51</sup> con respecto a las células H-2K<sup>b</sup> EL4 tratadas previamente con impulsos (●, ▲) o no (○, Δ) con pOVA a 10 µg/ml.

Figura 7

- 45 *Identificación de células esplénicas de presentación antigénica implicadas en la presentación de CyaAOVA in vitro o in situ, después de inmunización intravenosa*

- 50 *La fracción de baja densidad de esplenocitos presenta CyaAOVA a un hibridoma de células CD8<sup>+</sup> T, específico anti-OVA (a, b):*

Ensayo *in vitro* (a): Fracciones de baja (LDF, ●) y alta densidad (HDF, ▲) o esplenocitos totales no fraccionados de ratones sin tratamiento previo (*naive*) (TSC, ■, □) se cultivaron con B3Z, un hibridoma de células CD8<sup>+</sup> T específico para el péptido pOVA en el contexto de H-2K<sup>b</sup>. Después de 18 horas de cocultivo en presencia de CyaA detoxificado recombinante que transporta el péptido OVA (CyaAOVA, ●, ▲, ■) o un péptido de control (CyaALCMV, □) a diversas concentraciones, se midió la IL-2 liberada en los sobrenadantes en un ensayo de proliferación CTLL. Los resultados se expresan en Δcpm y se representan en gráficas con respecto a la concentración de CyaA durante el ensayo. Δcpm=[cpm + CyaA]-[cpm-CyaA].

- 60 Ensayo *ex vivo* (b): Se obtuvieron células de bazo de ratones inmunizados intravenosamente de forma previa (6-12 horas) con 50 µg de CyaAOVA (●, ▲, ■) o CyaALCMV (○) y se fraccionaron en LDF y HDF. Las cantidades diversas de células recuperadas de TSC (■), LDF (●, ○) o HDF (▲) o esplenocitos no fraccionados (■) se dispusieron directamente en el cultivo con B3Z sin adición de CyaA recombinante. La liberación de IL-2 se evaluó después de 18 horas de cultivo tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados, expresados en cpm, se representan en gráficas con respecto al número de APC presente en cada pocillo.

## ES 2 331 348 T3

*Las células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) son más APC eficientes para CyaAOVA que las células CD11b<sup>altas</sup>, las células c<sup>-</sup> o las células B (CD45R<sup>+</sup>) (c, d):*

Ensayo *in vitro* (c): Las células seleccionadas CD11c<sup>+</sup> (●) de LDF, CD11b<sup>altas</sup>, CD11c<sup>-</sup> (○) y las células seleccionadas CD45R<sup>+</sup> (■) de TSC, se cultivaron con B3Z durante 18 horas en presencia de varias concentraciones de CyaAOVA. IL-2 se evaluó como anteriormente.

Ensayo *ex vivo* (d): Las células seleccionadas mediante citometría de flujo de ratones C57BL/6 previamente (6-12 horas) inmunizados con 50 µg de CyaAOVA, se utilizaron como APC. Las células seleccionadas CD11c<sup>+</sup> (●), CD11b<sup>altas</sup>, CD11c<sup>-</sup> (○), CD45<sup>+</sup> (■) de esplenocitos de baja densidad, se cultivaron directamente durante 18 horas con B3Z en diversas cantidades de células por pocillo, sin añadir CyaAOVA. IL-2 se evaluó como antes.

*El subconjunto de células dendríticas mieloides CD8α<sup>-</sup> constituye un APC más eficiente para CyaA que el subconjunto de células dendríticas linfoides CD8α<sup>+</sup> (e, f):*

Las células CD11c<sup>+</sup> de baja densidad procedentes de los ratones sin tratamiento previo (e), o los ratones que se inmunizaron intravenosamente de forma previa (6-12 horas) con 50 µg de CyaAOVA (f), se fraccionaron en las células dendríticas mieloides (CD11c<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup>, ●) y en células dendríticas linfoides (CD11c<sup>+</sup> CD8α<sup>+</sup>, ○) mediante citometría de flujo, utilizándose como APC en ensayos *in vitro* (e) y *ex vivo* (f) para la estimulación B3Z. IL-2 se evaluó como anteriormente.

*La reducción genética de las células B no afecta la presentación de CyaAOVA por los esplenocitos (g, h):*

TSC (■, □), LDF (●, ○) o HDF (▲, △) de los ratones C57BL/6WT (■, ●, ▲) o las células B deficientes (□, ○, △), se utilizaron como APC en un ensayo *in vitro* (g, ■, □) o un ensayo *ex vivo* (h, ■, ●, ▲, □, ○, △) para la estimulación de B3Z como en a. Los ratones eran sin tratamiento previo (g) o inmunizados intravenosamente de manera previa (1,5 horas) con 50 µg de CyaAOVA (h). IL-2 se evaluó como anteriormente.

Figura 8

*La presentación de CyaAOVA por las células dendríticas requiere los transportadores TAP in vitro e in vivo después de la inmunización intravenosa*

Ensayo *in vitro* (a): Las células seleccionadas TSC (▲, △) o CD11c<sup>+</sup> (●, ○) de los ratones de control C57BL/6 TAP+/+ (▲, ●) o los ratones TAP-/- (△, ○), se cultivaron con B3Z en presencia o no de varias dosis de CyaAOVA. IL-2 se evaluó tal como se describe en la Figura 6a. Los resultados se expresan en cpm que se representan en gráficas con respecto a la concentración antigénica.

Ensayo *ex vivo* (b): Las células seleccionadas TSC (▲, △) o CD11c<sup>+</sup> (●, ○) de los ratones de control C57BL/6 TAP+/+ (▲, ●) o de los ratones TAP-/- (△, ○), inmunizados intravenosamente de forma previa con 50 µg de CyaAOVA, se cultivaron con B3Z durante 18 horas. IL-2 se evaluó tal como se describe en la Figura 6a. Los resultados se expresan en cpm, que se representan en gráficas con respecto al número de células cocultivadas.

Figura 9

*Papel de la integrina α<sub>M</sub>β<sub>2</sub> (CD11b) en la unión de CyaAOVA a las células*

La unión de CyaAOVA-biotina a TSC es bloqueada por anti-CD11b(a): Las suspensiones TSC se incubaron a 4°C con 10 µg/ml del anti-CD11b M1/70 mAb o con un mAb isotípico de control o con nada. Entonces, se añadió a las células durante 30 mn a 4°C, CyaAOVA-biotina a una concentración de 2 µg/ml (cuadro situado a la izquierda) o a varias concentraciones (cuadro situado a la derecha). Después de un lavado, la CyaAOVA-biotina se reveló con estraptavidina-PE durante 30 mn (Strep-PE). Entonces, después de lavado, las células se volvieron a suspender en PBS que contenía yoduro de propidio. El tamaño (FSC) de las células vivas canalizadas (o penetradas) mediante la exclusión del yoduro de propidio se representó en gráficas con respecto a la fluorescencia PE-Strep. El porcentaje de leucocitos positivos con respecto a CyaAOVA-biotina se representó en gráficas con respecto a la concentración de CyaAOVA-biotina durante la tinción.

La unión de CyaAOVA-biotina a células de baja densidad se correlaciona con la expresión de CD11b (b): LDF se tiñeron por triplicado para CD11b, CD8α y CyaOVBiotina (o medio) o, en experimentos separados, con CD11c, CD8α y CD11b (o un mAb de control). Después de un lavado, las células se tiñeron durante 30 minutos con Strep-PE para revelar CyaAOVA-biotina, anti-CD11c-FITC y anti-CD8α-APC. Se establecieron canales para las células linfoides DC (CD11c<sup>+</sup> CD8α<sup>+</sup>), células mieloides DC (CD11c<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup>), células CD8<sup>+</sup> T (CD11c<sup>-</sup> CD8α<sup>+</sup>) y otras células (CD11c<sup>-</sup> CD8α<sup>-</sup>). Para cada canal, la tinción de CyaAOVA-biotina o la tinción de CD11b se representó en gráficas con respecto al número de células en histogramas separados. Histogramas situados a la izquierda: suspensiones de LDF se

incubaron con 0 (histogramas en gris), 2,5 (histogramas abiertos, estrechos) o 10  $\mu\text{g/ml}$  (histogramas abiertos, gruesos) de CyaAOVA-biotina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Histogramas dispuestos a la derecha: control PE-isotípico (histograma gris), CD11b-PE (histogramas abiertos, delgados).

Figura 10

*Papel de la integrina  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b) en la presentación de CyaAOVA mediante MHC I*

Ensayo *in vitro* de presentación antigénica con TSC (a, b): Se llevaron a cabo los mismos experimentos que en a, b con los TSC de los ratones C57BL/6 sin tratamiento previo, como APC. La estimulación de B3Z se evaluó mediante la liberación de IL-2 en los sobrenadantes de cocultivo medidos en un ensayo de proliferación CTLL. Los resultados se representan en gráficas en cpm con respecto a la concentración de CyaAOVA o pOVA.

Ensayo *ex vivo* de presentación antigénica con TSC o las fracciones CD1b<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup> (c, d): ratones C57BL/6 se inmunizaron intravenosamente con 50  $\mu\text{g}$  de CyaAOVA (c) o 10  $\mu\text{g}$  de pOVA (d). Las células CD11b<sup>+</sup> (●) y CD11b<sup>-</sup> (○) se seleccionaron mediante citometría de flujo a partir de TSC (Δ) y se cultivaron en un número diverso por pocillo con B3Z. Después de 18 horas de cocultivo, la estimulación de B3Z se evaluó mediante la liberación de IL-2. Los resultados, expresados en cpm, se representan en gráficas con respecto a los números de APC a partir de animales inmunizados que se encuentran en cada pocillo.

## Ejemplos

### A. La toxina adenilato ciclasa de *Bordetella* interacciona específicamente con la integrina $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18)

#### A.1 Materiales y Métodos

##### A.1.1 Toxinas y anticuerpos recombinantes

Ya se ha descrito anteriormente el protocolo para la producción de CyaA [Karimova, *et al.*, 1998]. Las toxinas CyaA se produjeron en la cepa BLR de *E. coli* que aloja un plásmido de expresión, pCACT3, que transporta el gen estructural *cyaA* bajo el promotor lacUV5 y el gen accesorio *cyaC* necesario para la activación de la protoxina. Después de solubilización en 8M urea, Hepes-Na 20 mM, pH 7,5, se purificó el CyaA hasta una homogeneidad superior al 95%, (tal como se aprecia por el análisis SDS-gel, que no se muestra) mediante la DEAE-Sepharosa y la Fenil-Sepharosa secuenciales. Se construyó una toxina detoxificada recombinante CyaA, CACTE5-Cys-Ova, que alojaba una cisteína única inserta en el interior del dominio catalítico inactivado genéticamente, insertando un apropiado oligonucleótido de cadena doble entre los sitios BsiwI y KpnI de pCACT-Ova-ES [Guermónprez *et al.*, 2000] en la proteína resultante CACTE5-Cys-Ova, e insertándose la secuencia aminoácida ASCGSIINFEKLGIT entre los residuos 224 y 225 de CyaA. La toxina recombinante se expresó y purificó tal como se ha descrito anteriormente. La proteína purificada se marcó en su Cys única con el reactivo sulfhidrilo altamente específico N-(6-(Biotinamido)hexil)-3'-(2'-piridilditio) propionamida (Biotina-HPDP, PIERCE) según las instrucciones del fabricante. La CyaA biotinilada se volvió a purificar sobre DEAE-Sepharosa para eliminar el reactivo Biotin-HPDP que no había reaccionado. Las concentraciones de la toxina se determinaron espectrofotométricamente a partir de la adsorción a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molecular de  $142 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (estudios de unión) utilizando el sistema Biorad de ensayo proteico (acumulación de AMPc y estudios sobre la muerte celular).

Se crearon MAbs específicos purificados para CD11a murinas (2D7, IgG2a de rata,  $\kappa$ ), CD11b murinas y humanas (M1/70, IgG2b de rata,  $\kappa$ ), CD11c murinas (HL3, Hámster 1,  $\lambda$ ), CD18 murinas (C71/16, IgG2a de rata,  $\kappa$ ), control (A95-1, o anti-CD16/32, 2.4G2, IgG2b de rata,  $\kappa$ ), a partir de Phamingen (San Diego, USA). Sobrenadantes de hibridomas anti-CD11b humanos (44, IgG2a de ratón,  $\kappa$ ) y anti-CD18 humanos (TS/18, IgG1 de ratón,  $\kappa$ ) constituyeron un amable presente y se utilizaron con dilución 1/2 en experimentos de bloqueo. Sobrenadantes de CD11b antimurinos (5C6, IgG2b de rata,  $\kappa$ ) constituyeron un amable presente de G.Millon (Instituto Pasteur, París) y se utilizaron a una dilución final de 1/2 en ensayos de inhibición de la unión. Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-CyaA a partir de un conejo inmunizado subcutáneamente con CyaA purificado. Se precipitaron los sueros a partir del suero inmune mediante sulfato amónico (33%). Después de precipitación, las proteínas sedimentadas se volvieron a suspender en 20 mM Hepes-Na, 150 mM NaCl, pH 7,5 (tampón C), dializándose a continuación coextensamente contra el mismo tampón. Los anticuerpos se biotinizaron entonces mediante incubación con el éster Biotín-amidocaproato N-hidroxisuccinimida (SIGMA, disuelto en dimetilsulfóxido) durante 130 minutos a temperatura ambiente. Entonces, se añadieron 100 mM de etanolamina, pH 9,0, y después de 30 minutos adicionales de incubación, la mezcla se dializó extensamente a 4°C contra el tampón C. Los anticuerpos biotinilados se almacenaron a -20°C.

##### A.1.2 Células y medios de cultivo

EL4, J774A.1, LB27.4, THP-1 se obtuvieron de la "American Type Culture Collection" (ATCC) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal de vaca al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, cono sin  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  2-mercaptoetanol (medio completo). FSDC [Girolomoni *et al.*, 1995],

se cultivaron en medio completo. Las células CHO transfectadas para las CD11b/CD18 o CD11c/CD18 humanas, o transfectadas con sólo el vector, se obtuvieron de D. Golenbock (Boston, USA) y se cultivaron en presencia de neomicina, tal como se ha descrito previamente [Ingalls *et al.* 1998]. Los neutrófilos humanos se purificaron tal como se ha descrito previamente [Rieu *et al.* 1992].

### A.1.3. Ensayos de unión de CyaA

Todos los ensayos de unión se llevaron a cabo en DMEM 4,5 mg/ml glucosa (Life Technologies) sin suero, en placas de cultivo de 96 pocillos (Costar). Se incubaron  $2 \times 10^5$  células/pocillo durante 20 minutos a 4°C o 37°C, dependiendo de los experimentos) en un volumen final de 200  $\mu$ l. En algunos experimentos, las células se preincubaron durante 20 minutos a 4°C en presencia de mAbs bloqueantes en un volumen final de 100  $\mu$ l. Se añadió la solución de toxina a los pocillos en presencia continua de los mAbs en un volumen total de 200  $\mu$ l a 4°C. Entonces, se centrifugaron las placas a 1.500 rpm durante 5 minutos, eliminándose los sobrenadantes. Las células se incubaron a 4°C durante 25 minutos con anticuerpos policlonales anti-CyaA biotinilados de conejo (1/400 en DMEM, 50  $\mu$ l/pocillo) en presencia de un suero de control de conejo (no inmune o preinmune) como un agente de saturación (1/50).

Después de centrifugación y eliminación del sobrenadante, las células se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina (PE) (Pharmingen) con una dilución 1/300 (50  $\mu$ l/pocillo). Después de lavado, las células se analizaron mediante citometría de flujo en un FACStar (Becton-Dickinson, Mountain View, USA), en presencia de 5  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio. Se establecieron canales para excluir los agregados celulares y las células muertas, mediante la exclusión del yoduro de propidio. Se fijaron puntos experimentales para un modelo hiperbólico  $\Delta MFI = B_{max} * [CyaA] / (K_d + [CyaA])$ , con  $B_{max}$  = % de máxima unión, utilizando el programa Prism.

### A.1.4 Ensayo AMPc

Se midió la acumulación de AMPc mediante un inmunoensayo de competición antigénica [Karimova *et al.* 1998], en el que el medio de incubación estaba compuesto por DMEM sin suero, pero conteniendo 4,5 mg/ml de glucosa y 20 U/ml de hexoquinasa. La hexoquinasa, que cataliza la fosforilación ATP dependiente de la glucosa, se añadió para vaciar el medio extracelular de cualquier traza de ATP, previniendo así la síntesis extracelular de AMPc. Por tanto, la cantidad medida de AMPc representa la acumulación de AMPc estrictamente intracelular.

Se preincubaron  $5 \times 10^5$  células en placas de 96 pocillos en 100  $\mu$ l/pocillo, con o sin 10  $\mu$ g/ml de mAbs específicos a 4°C durante 1 hora, incubándose entonces a 37°C durante 20 minutos con 0,05, 0,5 ó 5 g/ml de CyaA y con 10  $\mu$ g/ml de mAbs específicos cuando se encuentren durante la preincubación. Para el efecto dosis-respuesta de CyaA, las células se incubaron directamente con la toxina durante 20 minutos a 37°C. Después de la intoxicación, se centrifugaron las células a 2.500 rpm durante 5 minutos. Se lisaron las muestras con 100  $\mu$ l de HCl 0,1N, se hirvieron durante 5 minutos a 120°C, y se neutralizaron con 100  $\mu$ l de Tris 0,125 M, NaCl 0,2M. Las placas microtituladoras se revistieron con conjugados AMPc-BSA diluidos a 1/4.000 en  $Na_2CO_3$  0,1M, pH 9,5. Se lavaron dos veces en PBS-Tween 0,1%, se saturaron durante 1 hora en PBS-BSA al 2%, y se lavaron cinco veces con PBS-Tween al 0,1%. Las muestras y el AMPc estándar (Sigma) se añadieron directamente a las placas revestidas con los conjugados AMPc-BSA y se diluyeron serialmente con una mezcla 1/1 de HCl 0,1 N y Tris 0,125 M<sup>-</sup> NaCl 0,2M. Se añadieron anticuerpos anti-AMPc de conejo a 1/2500 en PBS-BSA al 2% y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Se lavaron las placas cinco veces con PBS-Tween al 0,1% . Se añadieron anticuerpos anticonejo acoplados a peroxidasa de rábano (Amersham) a 1/2.500 en PBS-BSA al 2%, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se revelaron utilizando la clásica reacción peroxidásica. Se establecieron puntos experimentales de la curva estándar para un modelo sigmoide utilizando el programa Prism.

### A.1.5. Ensayo de toxicidad

Se evaluó la muerte celular tal como se describe previamente [Khelef *et al.* 1993; Khelef *et al.* 1995]. Brevemente, se incubaron  $10^5$  células durante 24 horas en una placa de 96 pocillos en un medio completo, y se lavaron una vez con medio libre de suero. Todas las incubaciones celulares se llevaron a cabo posteriormente en medio sin suero. Los efectos de respuesta a la dosis se evaluaron aplicando directamente varias concentraciones de CyaA a las células CHO a 37°C durante 4 horas. Para la inhibición de citotoxicidad, las células se preincubaron a 4°C durante 1 hora con o sin 10  $\mu$ g/ml de mAbs específicos, incubándose entonces a 37°C con 0,5  $\mu$ g/ml de CyaA durante 2 horas para las células J774A.1A.1, o con 5  $\mu$ g/ml durante 4 horas para las células CHO, y con 10  $\mu$ g/ml de mAbs específicos cuando estén presentes durante la preincubación. La lisis celular se evaluó utilizando el ensayo Cytotox 96<sup>TM</sup> (Promega), que cuantifica la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) que se libera en el medio por las células que mueren.

## A.2 Resultados

### A.2.1. La unión de saturación de CyaA se correlaciona con la presencia de CD11b en la superficie de las células diana

Para caracterizar la especificidad celular de CyaA con respecto a una población de leucocitos, se seleccionaron tres progenies celulares murinas representativas que expresan diversas combinaciones de integrinas  $\beta_2$ : J774A.1, un macrófago tumoral; EL4, un timoma de células T, y LB27.4, un linfoma de células B. Después de 20 minutos de incubación con CyaA a 37°C, se controló la unión de CyaA a la superficie celular de estas células mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos anti-CyaA biotinilados y estreptavidina-PE. Bajo estas condiciones, se apreció una unión eficiente, dependiente de la dosis y capaz de saturación, de CyaA a la progenie celular J774A.1. La afinidad de CyaA por las células J774A.1 fue alta, ya que la  $K_d$  aparente era de  $9,2 \pm 4,5$  nM y de  $3,2 \pm 1,9$  nM, respectivamente. Se observó una escasa unión de CyaA a las células EL4 y LB27.4, pero no fue capaz de saturación a la concentración ensayada.

Para determinar si la unión de CyaA a las progenies celulares J774 se correlacionaba con la expresión de uno de los elementos de la familia de la integrina  $\beta_2$ , se realizó un análisis fenotípico de estas células mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos para las tres cadenas  $\alpha$  de las bien caracterizadas integrinas  $\beta_2$  (CD11a, CD11b y CD11c) y para la habitual cadena  $\beta$  (CD18) (Figura 1b, c, d, e). Las células J774A.1 expresaron mayormente CD11b y CD18, pero fueron también positivas para CD11a. Las células EL4 y las LB27.4 expresaron mayormente CD11a y CD18. Considerándolos en conjunto, estos datos muestran que la unión eficiente y que puede saturarse de CyaA a J774A.1, se correlacionó con la presencia de la integrina CD11b/CD18.

### A.2.2 La unión que puede presentar saturación de CyaA está significativamente bloqueada por mAbs anti-CD11b

Se examinaron a continuación si CD11b/CD18 podrían estar implicadas directamente en la unión de CyaA a las células que expresaban esta integrina. Se realizó un análisis cuantitativo de la inhibición obtenida con anti-CD11b M1/70 mAb, calculando el porcentaje de los valores medios de fluorescencia en ausencia de mAbs a concentraciones fijas o variables de CyaA (Figura 2). La inhibición de la unión de CyaA obtenida con M1/70 anti-CD11b mAb fue casi total, a las mayores concentraciones de CyaA ensayadas (Figura 2a, b). Esta inhibición fue específica, ya que anti-CD11a, CD11c, CD18 o un mAb de control no inhibían la unión de CyaA. Un segundo anti-CD11b mAb (clon 5c6) inhibió también la unión de CyaA (Figura 2c, d). Se obtuvieron resultados similares con FSDC, una progenie celular dendrítica inmadura que expresa CD11b (Figura 2a, c) y la progenie celular de macrófagos J774A.1 (Figura 2b, d).

Para examinar si CyaA podría interactuar de forma similar con la CD11b humana, se llevaron a cabo estudios de unión de CyaA a neutrófilos humanos, en los que está bien establecida su alta expresión de CD11b. Ya que se obtuvo una intensa fluorescencia de fondo después de la incubación de las células mieloides humanas con los anticuerpos anti-CyaA de conejos (datos no representados), se puso en marcha un ensayo alternativo de unión. Una forma detoxificada de CyaA se sometió específicamente a biotinilación sobre residuos únicos de cisteína, introducidos genéticamente en el interior del dominio catalítico. Utilizando este sistema, se pudo detectar la unión de CyaA a los neutrófilos (Figura 3). La preincubación de neutrófilos con los mAbs 44 o M1/70 anti-CD11b mAbs, condujo a una inhibición completa o parcial, respectivamente, de la unión de CyaA (Figura 3a y b). De forma distinta a C71/16, la CD18 mAb antimurina, que no bloqueaba la unión de CyaA a las células murinas, la preincubación con la anti-CD18 TS/18 mAb humana, condujo a una inhibición completa de la unión de CyaA a los neutrófilos humanos (Figura 3b). Se obtuvieron resultados similares con la progenie celular monocítica humana THP-1 (resultados no representados).

En conclusión, la unión de CyaA a la superficie de tres progenies celulares mieloides de origen tanto humano como murino (J774A.1, FSDC, THP-1), así como de neutrófilos humanos recién purificados, parece ser mediada principalmente mediante la integrina CD11b/CD18.

### A.2.3 El aumento de AMPc mediado por CyaA y la toxicidad están bloqueados específicamente por un anti-CD11 mAb

Para evaluar la importancia fisiológica de la unión de CyaA dependiente de CD11b/CD18, se estudió el efecto, sobre la citotoxicidad de CyaA, de bloquear los mAbs. Se midió, en primer lugar, la cantidad de AMPc producida en las células J774A.1 expuestas a CyaA en presencia de varios mAbs. Tal como se expone en la Figura 4a, el aumento en el contenido del AMPc intracelular inducido por CyaA, se abolió totalmente cuando las células se preincubaron con los M1/70 mAb anti-CD11b. El C17/16 CD18 mAb antimurino que no había bloqueado la unión de CyaA a las células, (Figura 2), no tuvo efecto sobre el contenido de AMPc intracelular de las células tratadas con CyaA. Así, estos datos sugieren intensamente que el aumento en el AMPc intracelular inducido por CyaA, depende de la interacción de la toxina con CD11b. Para analizar posteriormente el requerimiento de esta molécula para la toxicidad de CyaA, se evaluó el efecto de mAbs específico para las distintas cadenas de la familia de la integrina  $\beta_2$  sobre la muerte celular mediada por CyaA. La Figura 4b muestra que mAb J774A.1 anti-CD11b redujo de forma importante la muerte celular inducida por CyaA (inhibición del 88%). La muerte celular inducida por CyaA no fue afectada cuando J774A.1 se preincubaron con mAbs que no bloqueaban la unión de la toxina a las células (anti-CD11a, CD11c o CD18 o un mAb de control).

Considerados conjuntamente, estos datos indican que la unión de CyaA mediante CD11D es estrictamente necesaria para la toxicidad mediada por CyaA en las células J774A.1.

#### 5 A.2.4. Transfección de las células CHO con CD11b/CD18 confiere sensibilidad a CyaA

Para confirmar el papel de CD11b en la unión de CyaA, se utilizaron las células CHO transfectadas con las integrinas humanas CD11b/CD18 o CD11c/CD18 o transfectadas simuladamente (sólo el vector). Tal como se muestra en la Figura 5a, CyaA podría unirse, a 37°C, a estas progenies celulares. Sin embargo, la unión de CyaA fue eficiente y capaz de saturación en las células CHO que expresan CD11b/CD18 pero no en CD11c/CD18 o células transfectadas simuladamente. La afinidad de CyaA por las células transfectadas CD11b/CD18 era del orden nM ( $K_d = 0,7 \pm 0,09$  nM). A 4°C, la eficiencia de la unión de CyaA se redujo cuando se comparó con la unión de a 37°C (Figura 5b). A esta temperatura, las diferencias entre las células transfectadas CD11b/CD18 y las otras dos progenies celulares fueron más pronunciadas.

Ya que que CD11b fue necesario para la toxicidad mediada por CyaA en J774A.1, se determinó entonces si la expresión de CD11b fue suficiente para conferir un fenotipo CyaA-sensible para las células CHO transfectadas. En línea con informes previos [Gordon *et al*, 1988], CyaA indujo una cantidad notable de AMPc intracelular en las células CHO transfectadas con CD11c/CD18 o en células de control transfectadas simuladamente, pero sólo altas concentraciones de la toxina (5 µg/ml, Figura 5c). Contrariamente a esto, CyaA aumentó el nivel intracelular de AMPc en las células CHO CD11b/CD18 transfectadas, incluso a la concentración más baja estudiada (0,05 µg/ml). Además, la producción de AMPc en respuesta a 5 µg/ml CyaA fue de 4 a 5 veces más elevada en las células CD11b/CD18 transfectadas comparadas con las células CD11c/CD18- o transfectadas simuladamente.

También se evaluó el papel de CD11b/CD18 en la muerte celular mediada por CyaA. Tal como se muestra en la figura 5d, más del 50% de las células CHO transfectadas con CD11b/CD18 murieron después de 4 horas de incubación con 5 µg/ml de CyaA, mientras las células CD11c/CD18- o transfectadas simuladamente no fueron afectadas por este tratamiento.

Estos resultados, pues, establecen claramente, de forma total, que la expresión de la integrina CD11b/CD18 humana es suficiente para crear un receptor de alta afinidad para CyaA en las células CHO.

#### 35 A.3 Exposición: Un receptor para CyaA

De distinta forma que otras toxinas, CyaA se ha considerado durante largo tiempo, como independiente de cualquier unión al receptor. Esto se basa en las observaciones de que i) CyaA puede intoxicar *in vitro* una amplia variedad de progenies celulares modelo de varios orígenes [Landant *et al*, 1999], ii) CyaA se une a las células de Jurkat y a los hematíes de oveja de una forma no saturable [Gray *et al*, 1999]. De hecho, estas observaciones establecieron que la adsorción no específica de CyaA a las membranas lipídicas conduce alguna translocación del dominio catalítico en el citosol. Sin embargo, no descartan la existencia de un receptor específico. Se mostró en este estudio sobre las progenies celulares mieloides que la unión y las propiedades tóxicas de CyaA dependen de su interacción con la integrina CD11b/CD18. La unión eficiente y capaz de saturación se correlaciona con la expresión de CD11b y está completa y específicamente bloqueada por los anti-CD11b Abs. Además, la expresión de CD11b/CD18 en las células CHO potencia en gran manera la unión de CyaA, dando lugar a un aumento en la sensibilidad a la intoxicación por esta toxina. Los resultados constituyen la primera evidencia que apoya la interacción de CyaA con una molécula superficial celular que se expresa específicamente en los leucocitos. El bloqueo casi completo de la unión de CyaA por los anti-CD11b mAbs, sugiere que CD11b es el principal receptor para CyaA en las progenies celulares ensayadas. La falta de una unión eficiente a los transfectantes CD11c/CD18, o las células que expresan CD11a/CD18 tales como EL4 o LB27.4, sugieren que CD11b/CD18 es la única integrina de la familia  $\beta_2$  que está implicada en la unión de CyaA a las células diana.

De acuerdo con estudios previos, se observó que podía detectarse una unión de CyaA a todas las progenies celulares que se habían ensayado. Además, CyaA altas concentraciones provocaba un aumento pequeño pero detectable de AMPc en las células CHO transfectadas simuladamente, que no se asocia con la muerte celular. Así, a altas concentraciones, CyaA puede unirse a y translocarse en una amplia variedad de progenies celulares, pero una unión eficiente y capaz de saturarse, la translocación y la muerte constituye una marca de las células que expresan CD11.

La unión de CyaA a un elemento de la familia de las integrinas  $\beta_2$ , recuerda el comportamiento de otras toxinas RTX, las cuales se encontró recientemente que interactuaban con estas moléculas [Lally *et al*, 1997; Li *et al*, 1999; Ambagala *et al*, 1999; Jeyaseelan *et al*, 2000]. La HlyA de *E. coli*, que comparte una alta homología con CyaA, forma poros catiónicos en la membrana plasmática. HlyA muestra una especificidad para los leucocitos, pero sólo a concentraciones bajas [Welch *et al*, 1991]. Se mostró que esta especificidad relativa era mediada por su interacción con la integrina CD11a/CD18 [Lally *et al*, 1997]. De modo similar, una leucotoxina *A. actinomycetemcomitans* y *P. haemolytica* (LtxA y LktA, respectivamente), que son toxinas RTX menos promiscuas, específicas para los leucocitos humanos y bovinos, respectivamente, interaccionan también con CD11a/CD18 [Lally *et al*, 1997; Li *et al*, 1999; Ambagala *et al*, 1999; Jeyaseelan *et al*, 2000]. A pesar de su alta homología con HlyA, CyaA reconoce otra integrina  $\beta_2$  (CD11b/CD18) cuya distribución celular es distinta. En verdad, CD11b se expresa en su mayor D parte en los

macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, pero no en la mayoría de las células T y B, mientras que CD11a se expresa en todos los leucocitos, incluyendo los linfocitos T y B.

Esta diana específica de CyaA en las células que expresan CD11b, se aprovecha en la presente invención para hacer diana específicamente en este subconjunto particular de células. Los mutantes detoxificados de CyaA que permanecen invasivos, podrían utilizarse para el suministro de moléculas farmacológicamente activas a las células CD11b positivas, sin que afectaran a otros tipos celulares.

## Ejemplos comparativos

### B. Suministro antigénico dirigido al citosol de las células dendríticas mieloides y sensibilización CTL selectiva

#### B.1 Materiales y Métodos

##### B.1.1 Toxinas adenilato ciclasa recombinantes y péptido

El péptido sintético pOVA (SIINFELK) se originó a partir de NEOSYSTEM y se diluyó en PBS a 1 mg/ml.

##### B.1.2 Inmunización y ensayo para la detección de las células T citotóxicas

Se utilizaron hembras C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) de Iffa Credo (L'arbrèsle, Francia) de entre 6 y 8 semanas de edad. TAP1-/- (Van Kaer *et al.*, 1992), CD4-/- (Killeen *et al.*, 1993), CD40-/- (Kawabe *et al.*, 1994) y células B  $\mu$ MT deficientes (Kitamura *et al.*, 1991), se criaron originariamente con cepas C57BL/6 procedentes de las instalaciones CDTA (CNRS, Orleans, Francia), criándose posteriormente en las instalaciones del Instituto Pasteur. Los animales se inmunizaron intravenosamente con Ag en PBS. Siete días después de la inyección, se sacrificaron los animales y se obtuvo el bazo. Suspensiones de células únicas de esplénocitos ( $2,5 \times 10^7$  células) se volvieron a estimular en 10 ml CM (véase a continuación) con células irradiadas del bazo ( $2,5 \times 10^7$  células) durante 5 días en presencia de 1  $\mu$ g/ml pOVA. Se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad, exactamente tal como se había descrito previamente (Fayolle, *et al.*, 1999).

##### B.1.3 Progenies celulares

B3Z (Karttunen *et al.*, 1992), un hibridoma de células CD8<sup>+</sup> T específico para el péptido OVA 257-264 (SIINFELK) en el contexto de H-2K<sup>b</sup> constituyó una generosa donación del Dr. N. Shastri (University of California, Berkeley, USA).

##### B.1.4. Ensayos de presentación antigénica

Todos los ensayos de presentación antigénica se llevaron a cabo mediante cocultivo de APC con B3Z en microplacas de cultivo de 96 pocillos (0,2 ml de volumen final) en medio RPMI 1640 suplementado con Suero Fetal de Ternera al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, y  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoetanol (medio completo, CM). La estimulación de las células B3Z ( $10^5$  células/pocillo) se controló mediante la liberación de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de 18-24 horas en presencia de APC. IL-2 se midió en el ensayo CTL tal como se ha descrito anteriormente (Guermonprez *et al.*, 1999). En algunos experimentos (véase la leyenda de las figuras) la estimulación de B3Z se evaluó utilizando el ensayo informador NF-AT lacZ. La actividad de LacZ en los lisados celulares se evaluó con el sustrato CPRG tal como se ha descrito previamente (Karttunen *et al.*, 1992). Se llevaron a cabo dos ensayos de presentación antigénica: i) ensayo *in vitro*: APC originado de los ratones sin tratamiento previo se cocultivaron ( $10^5$ /pocillo) con B3Z en presencia de Ag a varias concentraciones. En algunos experimentos, se preincubó o no APC con mAbs a 10  $\mu$ g/ml durante 40 minutos a 4°C, añadiendo entonces Ag a las células en un volumen final de 100  $\mu$ l en presencia continua de los mAbs. Después de someterlo a impulsos durante 4 horas, se lavaron los APC dos veces y se dispusieron en el cocultivo con B3Z. Los mAbs purificados que se utilizaron, lo fueron contra CD11b (M1/70 ratigG2b,  $\kappa$ ) o control isotipo-emparejados, originándose de Pharmingen (San Diego, USA). ii) Ensayo *ex vivo*: APC originado de los ratones inmunizados intravenosamente de forma previa con varios Ags, se cocultivaron con B3Z en un volumen final de 0,2 ml con varios miembros de APC por pocillo.

##### B.1.5 Células presentadoras de antígenos y clasificaciones

Según el protocolo de Steinman modificado por Vremec *et al.* (Vremec *et al.*, 1992), se prepararon células totales del bazo (TSC), fracciones de baja densidad (LDF) y fracciones de alta densidad (HDF). Brevemente, se sometieron a digestión los bazos con collagenasa durante 40 minutos a 37°C, lacerándose entonces y preparándose en presencia continua de EDTA 5 mM. Se centrifugaron las células en una solución densa de BSA. Se recuperaron aparte sobrenadantes y células del sedimento, y se denominaron fracciones de baja y alta densidad. Se llevó a cabo una tinción de CD11c a 4°C en PBS suplementado con Suero Fetal de Vaca al 5% y 2 mM EDTA (PBS-FACS), con el HL3 mAb de hámster acoplado a la ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), o biotinilado y revelado entonces me-

diente Streptavidina-PE. La tinción de CD8 $\alpha$  se llevó a cabo con el 53-6.7 mAb acoplado a PE. La tinción de CD11b se llevó a cabo con el M1/70 mAbs acoplado a PE o FITC. La tinción de CD54R se llevó a cabo con el B220 mAb acoplado a PE o biotinilado y revelado mediante estreptavidina-PE. Todos los mAbs se originaron en Pharmingen. Después de dos lavados, las células se clasificaron utilizando un FACStar (Beckton Dickinson, Mountain View, USA). Las células se recuperaron asépticamente en CM. Se revisó la pureza de las células clasificadas en una parte alícuota de las células clasificadas, analizadas en un dispositivo FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View, USA). La pureza de las células clasificadas estuvo entre el 80 y el 98%. En otros experimentos (tal como los mencionados en las leyendas de las figuras), células CD11c<sup>+</sup> se clasificaron directamente a partir de los digestos de colagenasa de los bazos, utilizando la tecnología desde CD11c Micro Perlas y el Clasificador Magnético Celular según los protocolos del suministrador (MACS, MiltenylBiotec, Bergish Gladbach, Alemania). Con esta técnica, la pureza de las células clasificadas era aproximadamente de 80%.

## B.2 Resultados

### B.2.1. Sensibilización CTL independiente de CD4<sup>-</sup> y CD40<sup>-</sup>, después de inmunización sistémica con CyaAOVA en ausencia de adyuvante

El epítipo SIINFEKL, H-2K<sup>b</sup> limitado, de la ovoalbúmina de pollo, se utilizó como un modelo epitópico experimental. Se insertó genéticamente en el dominio catalítico de un CyaA mutante detoxificado, todavía invasivo. Se inmunizaron intravenosamente una vez, con 50  $\mu$ g de la toxina recombinante o de la solución salina de control, ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>). Siete días después de la inmunización, se detectó actividad CTL específica para pOVA en el interior de esplenocitos de los ratones C57BL/6 inmunizados con CyaAOVA, pero no en los ratones a los que se había inyectado solución salina o un CyaA de control (figura 6a). Se obtuvieron resultados similares con ratones deficientes CD4 o CD40 que indicaban que, de forma distinta a muchas otras respuestas CTL, (como las producidas contra la sensibilización cruzada Ag (Bennett *et al.*, 1997; 1998; Schoenberger *et al.*, 1998, Ridge *et al.*, 1998), el auxilio de las células CD4<sup>+</sup> T no fue preceptivo para la sensibilización de las respuestas CTL por CyaAOVA (figura 6b, c). Además, las células B no se necesitaron, ya que las respuestas CTL se obtuvieron también en los ratones deficientes en células B (IgM-L-, figura 6d). Los contaminantes LPS, actuando posiblemente como adyuvantes, no están implicados en la estimulación de las respuestas CTL CyaAOVA, ya que los ratones C57BL 10ScSn y los C57BL10ScCr LPS- hipo respondedores mostraron una respuesta CTL OVA-específica similar después de la inyección de CyaAOVA (no se muestra).

### B.2.2 Objetivo *in vitro* e *in vivo* de la presentación de CyaAOVA a las células que expresan CD11b

Para entender mejor la inmunogenicidad de CyaAOVA, se intentó determinar el APC involucrado en su presentación a las células CD8<sup>+</sup>T. Utilizando la secreción de IL-2 como una alteración para la estimulación, se demostró que B3Z, un hibridoma anti-OVA de células CD8<sup>+</sup>T, H-2K<sup>b</sup> limitado, es estimulado *in vitro* por el conjunto de esplenocitos en presencia de CyaAOVA pero no de CyaALCMV (figura 7a). Se intentó analizar la capacidad APC de tres APC esplénicos bien definidos: DC(CD11c<sup>+</sup>), células B (CD45R<sup>+</sup>) y macrófagos/granulocitos (CD11b<sup>alto</sup> + CD11c<sup>-</sup>). Debido al bajo porcentaje de CD11c<sup>+</sup> en los esplenocitos totales (<1%), se realizó el fraccionamiento de la densidad y se clasificaron los CD11c<sup>+</sup> a partir de la población de baja densidad (4-10%) enriquecida en DC, mediante citometría de flujo. La fracción de alta densidad contenía sólo cantidades traza de células CD11c<sup>+</sup>. Contrariamente a esto, la distribución de las células CD45R<sup>+</sup> y CD11b<sup>alto</sup>+CD11c<sup>-</sup> (compuestas por granulocitos/macrófagos) en ambas fracciones, permitió la clasificación de la población total para estos marcadores. Tal como se muestra en la figura 7c, CyaAOVA fue presentada de forma más eficiente por DC, menos eficientemente por las células B y CD11b<sup>alto</sup>+CD11c<sup>-</sup>. Esto se correlaciona con una distribución casi exclusiva de la capacidad presentadora del antígeno en el interior de la fracción de baja densidad de los esplenocitos (figura 7a). Contrariamente a esto de forma drástica, tanto las fracciones de baja como de alta densidad pudieron estimular B3Z en respuesta a pOVA (no se muestra).

Para detectar los complejos K<sup>b</sup>-OVA formados *in vivo* después de la inmunización, el APC preparado a partir de los ratones inmunizados intravenosamente 8-15 horas antes con 50  $\mu$ g de CyaAOVA se cocultivaron con B3Z *in vitro* sin añadir Ag (ensayo *ex vivo*). Como para los ensayos *in vitro*, los APC responsables de la presentación de CyaAOVA, estaban presentes exclusivamente en la fracción de baja densidad de esplenocitos enriquecida en DC (figura 7b). Se comprobó la especificidad del ensayo con APC de los ratones inmunizados con CyaALCMV que no estimularon B3Z (figura 7b). Para caracterizar posteriormente el APC de baja densidad implicado en la presentación de CyaAOVA, se realizaron clasificaciones celulares: los resultados que se exhiben en la figura 7d muestran que la fracción DC (CD11c<sup>+</sup>) fue el APC más eficiente. Las células macrófago-granulocitos (CD11b<sup>alto</sup>+CD11c<sup>-</sup>) y las células B (CD45R<sup>+</sup>) clasificadas a partir de la misma fracción, fueron muy ineficaces para la estimulación de B3Z.

Para caracterizar posteriormente el APC implicado en CyaAOVA, se llevó a cabo el subfraccionamiento del subconjunto mieloide esplénico de baja densidad CD11c<sup>+</sup>DC In CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> y el subconjunto linfóide CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* (figura 7e y f, respectivamente), mostraron que la capacidad de presentación antigénica para CyaAOVA estaba retenida por el subconjunto mieloide que también expresaba CD11b<sup>+</sup>, de forma distinta al subconjunto linfóide que expresaba niveles bajos de esta integrina (Pulendran *et al.*, 1997; Vremec *et al.*, 1997).



## ES 2 331 348 T3

La incapacidad del subconjunto linfóide  $CD11c^+CD8\alpha^+$  para presentar CyaAOVA fue específica para CyaAOVA, ya que  $CD11c^+CD8\alpha^+$  y  $CD11c^+CD8\alpha^-$  presentaron igualmente bien el péptido sintético pOVA a B3Z.

Los ensayos *in vitro* y *ex vivo* llevados a cabo con esplenocitos de control (C57BL/6) o ratones deficientes en células B ( $IgM^{-/-}$ ) confirmaron la escasa contribución de las células B a la presentación de CyaAOVA *in vitro* e *in vivo* (figura 7g y h). De acuerdo con estos resultados, las respuestas CTL inducidas por CyaAOVA no fueron afectadas significativamente en ratones deficientes en células B, comparadas con los ratones de control (figura 5d).

B.2.3. La presentación de CyaAOVA por las células dendríticas limitada a MHC I, depende del suministro citosólico de la toxina recombinante, tanto *in vitro* como *in vivo*

Para determinar si la presentación de CyaAOVA depende del suministro citosólico del epítipo OVA o de una carga extracelular, se realizaron ensayos de presentación de Ag con la totalidad de los esplenocitos o  $CD11c^+DC$  de TAP-/- o TAP+/+ de control esplénicos purificados a partir de animales que no habían sido sometidos a tratamiento previo (*in vitro*, figura 8a) o de animales inmunizados intravenosamente con CyaAOVA (*ex vivo*, figura 8b). Los resultados muestran que la presentación de CyaAOVA mediante las células dendríticas depende completamente de TAP, *in vitro* o *in vivo*. Ya que la presentación de pOVA es un fenómeno independiente de TAP, se comprobó la funcionalidad de TAP-/- DC clasificado a partir de ratones inmunizados con CyaAOVA, estimulando B3Z con estas células cargadas *in vitro* con el péptido pOVA (no se muestra). Estos resultados muestran que la presentación *in vivo* de CyaAOVA depende del suministro citosólico.

B.2.4 La interacción de CyaA con  $CD11b$  es necesaria para la unión celular y el suministro del antígeno insertado a la vía citosólica para la presentación antigénica mediante MHC I

Se mostró en la parte A que la unión eficiente y capaz de saturación de CyaA WT a las células  $CD11b^+$ , puede bloquearse específicamente mediante mAbs anti- $CD11b$ . Además, la transfección de  $CD11b$  confirió específicamente una unión capaz de saturación y sensibilidad para CyaA WT a células diferentes  $CD11b^-$  resistentes a CyaA WT. El bloqueo de la unión celular por los anti- $CD11b$  mAbs inhibió el subsiguiente suministro intracelular del dominio catalítico de la adenilato ciclasa, la elevación de AMPc y la muerte celular inducida por CyaA WT. Ya que estos resultados se obtuvieron en progenies celulares, falto por determinar si CyaA se une a los esplenocitos. Se puso en marcha un ensayo de citometría de flujo para detectar la fijación de una forma detoxificada y biotinilada de CyaA que transportara el péptido OVA (CyaAOVAbiotina), a suspensiones totales de esplenocitos con estreptavidina acoplada a fosfoeritrina. Utilizando este ensayo, se observó que CyaAOVA se une a un subconjunto de leucocitos en el interior de la suspensión total de esplenocitos (5-7%). La preincubación con el anti- $CD11b$  M1/70 mAb, pero no con un mAb de control, abrogó esta unión (figura 9a). Además, existe una correlación entre la expresión de  $CD11b$  y la unión de CyaAOVA a las células de baja densidad; CyaAOVA se une eficientemente a  $CD11c^+CD8\alpha^-$  que expresa niveles altos de  $CD11b$ , menos eficientemente a  $CD11c^+CD8\alpha^+$  que expresa niveles bajos de  $CD11b$  y muy débilmente a las células  $CD11c^-CD8\alpha^+$  T que no expresan  $CD11b$  (figura 9b). Es evidente que CyaAOVA se une eficientemente a un bajo porcentaje de las células  $CD11c^-CD8\alpha^-$  en correlación con la presencia de  $CD11b^{alto+}$  en esta población  $CD11c^-$ . Así, la unión de CyaAOVAbiotina es mediada por  $CD11b$  (como para CyaA WT) y predice la capacidad de un tipo celular dado para presentar CyaAOVA.

*In vitro*, se mostró que el anti- $CD11b$  mAb M1/70 bloquea la presentación de CyaAOVA por las células TSC a B3Z (figura 10a). Este bloqueo es específico, ya que i) un mAb de control o mAb específico para otros miembros de la familia de la integrina  $\beta_2$  (anti- $CD11a$ ,  $CD11c$ ) tuvieron poco o no tuvieron efecto (figura 10a y datos que no se muestran), ii) la presentación de pOVA no se vio afectada por el anti- $CD11b$  o ninguno de estos mAbs (figura 10b y datos no representados). Esto confirma que  $CD11b$  es el principal receptor para CyaAOVA al menos en el bazo, y que la interacción CyaAOVA- $CD11b$  es preceptiva para la presentación del epítipo insertado.

Finalmente, para dilucidar el papel de las células que expresan  $CD11b$  en la presentación de CyaAOVA, se realizaron experimentos de clasificación sobre la totalidad de las células esplenocíticas de los ratones inmunizados con CyaAOVA o pOVA. La totalidad de las células esplenocíticas se clasificaron en fracciones  $CD11b^+$  y  $CD11b^-$ . Mientras que las dos subpoblaciones estimulaban B3Z después de la inmunización intravenosa de pOVA (figura 10d), sólo la subpoblación  $CD11b^+$  estimulaba B3Z después de la inmunización intravenosa de CyaAOVA (figura 10 c).

Considerados conjuntamente, estos resultados establecen claramente que la presentación del péptido OVA de CyaAOVA depende de la unión celular y de este modo, de la interacción con  $CD11b$ .

### B.3. Exposición

En este estudio, utilizando la adenilato ciclasa detoxificada de *Bordetella pertussis* como un vector de suministro epitópico, se estableció una estrategia para la inmunización que sensibiliza las respuestas CTL después de una inyección única, evitando la necesidad de un adyuvante. Se identificaron mecanismos que contribuyen a la alta eficiencia de la CyaA detoxificada como un vector.

## B.3.1. Células dendríticas mieloides diana de CyaA mediante su interacción con la integrina CD11b

El ensayo de presentación antigénica a un hibridoma específico de células CD8<sup>+</sup> T utilizando APC cargado *in vitro* o *in vivo* (ensayo *in vitro* y *ex vivo*, respectivamente), demostró que los APC más eficientes para CyaAOVA son CD11c<sup>+</sup> DC. En verdad, toda la capacidad de presentación de Ag para CyaAOVA perteneció a la fracción de baja densidad de los esplenocitos que conserva DC. La clasificación celular de los tipos celulares definidos reveló que las células CD11c<sup>+</sup> DC son mucho más eficientes que las células CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>alto+</sup>. La menor contribución que se observa para las células B (CD45R<sup>+</sup>) se confirmó por la eficiente presentación de CyaAOVA (*in vitro* y *ex vivo*) y las respuestas CTL en los ratones deficientes en las células B.

B.3.2 Ag suministra CyaA a la vía citosólica para la presentación *in vivo* de MHC de tipo I

Se muestra a continuación la dependencia de la presentación de CyaAOVA a los esplenocitos totales *in vitro*. Sorprendentemente, se muestra asimismo que la presentación *in vivo* de CyaAOVA tiene lugar asimismo según una vía dependiente de TAP. Esto conduce a la conclusión de que la presentación de CyaAOVA *in vivo* resultó efectivamente a partir del suministro citosólico y no de una degradación extracelular eventual.

B.3.3 La sensibilización de CTL evita el auxilio de las células CD4<sup>+</sup>T y es independiente de la señalización de CD40

La maduración a partir de un estadio inmaduro hacia uno maduro se caracteriza por i) una disminución en la capacidad de captura de Ag, ii) un aumento en la capacidad de sensibilización de las células T, iii) una migración a partir de los sitios de muestreo de Ag (zona marginal en el bazo) hacia el área de las células T (láminas periarteriolas en el bazo), donde maximizan la probabilidad de encontrarse con las células T específicas de Ag (De Smedt *et al.*, 1996). Además de la presentación de Ag por DC, la fase de maduración se asume ampliamente en la actualidad como un prerrequisito para la sensibilización de las células T. Estudios *in vitro* han aclarado el papel de las células CD4<sup>+</sup> T en la señalización de la maduración de DC, especialmente mediante la interacción CD40L-CD40 (Bell *et al.*, 1999). En el caso de la sensibilización de las células CD8<sup>+</sup> T, después de la sensibilización cruzada del Ag celular, las células CD4<sup>+</sup> T dispensan su ayuda a las células CD8<sup>+</sup> T en un mecanismo que depende de CD40 (Schuurhuis *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998; Ridge *et al.*, 1998). Ya que CyaAOVA sensibiliza CTL de una forma CD4 y CD40 independiente, es tentador especular que el CyaA detoxificado podría estar provisto de capacidad adyuvante intrínseca.

## B.3.4 Conclusión

Este estudio representa la primera caracterización, conocida, de un vector vacunal proteínico que tiene como finalidad el APC profesional, el suministro citosólico del Ag vectorizado y la sensibilización de CTL sin adyuvante. Además, se dilucidó el mecanismo de las dianas celulares, demostrando que la presentación de Ag depende de la interacción entre CyaA y CD11b, su receptor. Por tanto, la especificidad celular de CyaA está adaptada serendipitosamente a la finalidad del suministro de Ag. Finalmente, la especificidad celular de CyaA o de otras toxinas bacterianas, puede servir para el suministro citosólico de un amplio conjunto de moléculas relevantes farmacéuticamente, cuyos efectos deberán dirigirse a un restringido conjunto de células.

## Bibliografía

1. Aichele, P., D. Kyburz, P.S. Ohashi, B. Odermatt, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, y H. Pircher. 1994. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, no. 2:444-8.
2. Aichele, P., K. Brduscha-Riem, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, y H. Pircher. 1995. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *Journal of Experimental Medicine* 182, no. 1: 261-6.
3. Ballard, J.D., R.J. Collier, y M.N. Starnbach. 1996. Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 22:12531-4.
4. Bassinet, L., P. Gueirard, B. Maitre, B. Housset, P. Gounon, y N. Guiso. 2000. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68, no. 4:1934-41.
5. Bell, D., J.W. Young, y J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Advances in Immunology* 72: 255-324.
6. Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, J.F. Miller, y W.R. Heath. 1997. Induction of a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 1:65-70.

7. **Bennett, S.R., F.R. Carbone, T. Toy, J.F. Miller, y W.R. Heath.** 1998. B cells directly tolerize CD8 (+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 11:1977-83.

8. **Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, y W.R. Heath.** 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling [see comments]. *Nature* 393, no. 6684: 478-80.

9. **Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann, y P. Sebo.** 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, no. 44:27231-9.

10. **Carbonetti, N.H., T.J. Irish, C.H. Chen, C.B. O'Connell, G.A. Hadley, U. McNamara, R.G. Tuskan, y G.K. Lewis.** 1999. Intracellular delivery of a cytolytic T-lymphocyte epitope peptide by pertussis toxin to major histocompatibility complex class I without involvement of the cytosolic class I antigen processing pathway. *Infection & Immunity* 67, no. 2: 602-7.

11. **Casares, S., K. Inaba, T.D. Brumeanu, R.M. Steinman, y C.A. Bona.** 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 9:1481-6.

12. **Condon, C., S.C. Watkins, C.M. Celluzzi, K. Thompson, y L.D. Falo, Jr.** 1996. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Medicine* 2, no. 10:1122-8.

13. **Confer, D.L., y J.W. Eaton.** 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217, no. 4563:948-50.

14. **Coote, J.G.** 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 8, no. 2:137-61.

15. **Crowley, M., K. Inaba, y R.M. Steinman.** 1990. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *Journal of Experimental Medicine* 172, no. 1:383-6.

16. **De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, y M. Moser.** 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* 184, no. 4: 1413-24.

17. **Fayolle, C., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, y C. Leclerc.** 1999. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *Journal of Immunology* 162, no. 7:4157-62.

18. **Friedman, R.L., R.L. Fiederlein, L. Glasser, y J.N. Galgiani.** 1987. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infection & Immunity* 55, no. 1:135-40.

19. **Fuchs, E.J., y P. Matzinger.** 1992. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258, no. 5085: 1156-9.

20. **Gray, M., G. Szabo, A.S. Otero, L. Gray, y E. Hewlett.** 1998. Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *Journal of Biological Chemistry* 273, no. 29:18260-7.

21. **Gross, M.K., D.C. Au, A.L. Smith, y D.R. Storm.** 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, no. 11:4898-902.

22. **Gueirard, P., A. Druilhe, M. Pretolani, y N. Guiso.** 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infection & Immunity* 66, no. 4:1718-25.

23. **Guermonprez, P., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, y C. Leclerc.** 1999. Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *Journal of Immunology* 162, no. 4:1910-6.

24. **Guery, J.C., F. Ria, y L. Adorini.** 1996. Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *Journal of Experimental Medicine* 183, no. 3:751-7.

25. **Guery, J.C., F. Ria, F. Galbiati, S. Smiroldo, y L. Adorini.** 1997. The mode of protein antigen administration determines preferential presentation of peptide-class II complexes by lymph node dendritic or B cells. *International Immunology* 9, no. 1:9-15.

26. **Guiso, N., M. Rocancourt, M. Szatanik, y J.M. Alonso.** 1989. Bordetella adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. *Microbial Pathogenesis* 7, no. 5:373-80.
27. **Guiso, N., M. Szatanik, y M. Rocancourt.** 1991. Protective activity of Bordetella adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microbial Pathogenesis* 11, no. 6:423-31.
28. **Harvill, E.T., P.A. Cotter, M.H. Yuk, y J.F. Miller.** 1999. Probing the function of Bordetella bronchiseptica adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infection & Immunity* 67, no. 3: 1493-500.
29. **Hewlett, E., y J. Wolff.** 1976. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. *Journal of Bacteriology* 127, no. 2:890-8.
30. **Jeyaseelan, S., S.L. Hsuan, M.S. Kannan, B. Walcheck, J.F. Wang, M.E. Kehrli, E.T. Lally, G.C. Sieck, y S.K. Maheswaran.** 2000. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for Pasteurella haemolytica leukotoxin in bovine leukocytes. *Infection & Immunity* 68, no. 1:72-9.
31. **Karimova, G., C. Fayolle, S. Gmira, A. Ullmann, C. Leclerc, y D. Ladant.** 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the *in vivo* delivery of CD8(+)T cell epitopes into antigenpresenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 21:12532-7.
32. **Karttunen, J., S. Sanderson, y N. Shastri.** 1992. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, no. 13:6020-4.
33. **Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, y H. Kikutani.** 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, no. 3:167-78.
34. **Khelef, N., H. Sakamoto, y N. Guiso.** 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microbial Pathogenesis* 12, no. 3:227-35.
35. **Khelef, N., A. Zychlinsky, y N. Guiso.** 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infection & Immunity* 61, no. 10:4064-71.
36. **Khelef, N., y N. Guiso.** 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiology Letters* 134, no. 1:27-32.
37. **Khelef, N., C.M. Bachelet, B.B. Vargaftig, y N. Guiso.** 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infection & Immunity* 62, no. 7:2893-900.
38. **Killeen, N., S. Sawada, y D.R. Littman.** 1993. Regulated expression of humanCD4rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO Journal* 12, no. 4:1547-53.
39. **Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, y K. Rajewsky.** 1991. ABcell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, no. 6317:423-6.
40. **Kyburz, D., P. Aichele, D.E. Speiser, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, y H. Pircher.** 1993. T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *European Journal of Immunology* 23, no. 8:1956-62.
41. **Ladant D., Glaser P. y A. Ullmann.** 1992. Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* Adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* (4), no. 267: 2244-2250.
42. **Ladant, D., y A. Ullmann.** 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology* 7, no. 4:172-6.
43. **Njamkepo, E., F. Pinot, D. Francois, N. Guiso, B.S. Polla, y M. Bachelet.** 2000. Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol* 183, no. 1:91-9.
44. **Otero, A.S., X.B. Yi, M.C. Gray, G. Szabo, y E.L. Hewlett.** 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 17:9695-9697.
44. **Porgador, A., K.R. Irvine, A. Iwasaki, B.H. Barber, N.P. Restifo, y R.N. Germain.** 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 6:1075-82.

45. **Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, y E. Maraskovsky.** 1997. Developmental pathways of dendritic cells *in vivo*: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *Journal of Immunology* 159, no. 5:2222-31.
- 5 48. **Reis e Sousa, C., y R.N. Germain.** 1999. Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation *in vivo*: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue. *Journal of Immunology* 162, no. 11:6552-61.1
- 10 49. **Ridge, J.P., F. Di Rosa, y P. Matzinger.** 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, no. 6684:474-8.
50. **Rogel, A., y E. Hanski.** 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 267, no. 31:22599-22605.
- 15 51. **Rose, T., P. Sebo, J. Bellalou, y D. Ladant.** 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium- induced conformational changes. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 44:26370-6.
- 20 53. **Sakamoto, H., J. Bellalou, P. Sebo, y D. Ladant.** 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *Journal of Biological Chemistry* 267, no. 19:13598-602.
- 25 54. **Schoenberger, S.P., R.E. Toes, E.I. van der Voort, R. Offringa, y C.J. Melief.** 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40- CD40L interactions [see comments]. *Nature* 393, no. 6684:480-3.
- 30 55. **Schuurhuis, D.H., S. Laban, R.E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M.J. Kleijmeer, E.I. van Der Voort, D. Rea, R. Offringa, H.J. Geuze, C.J. Melief, y F. Ossendorp.** 2000. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli [In Process Citation]. *J Exp Med* 192, no. 1:145-50.
56. **Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H., y Ullmann, A.** 1991. *Gene* 104, 19-24.
57. **Viola, A., G. Iezzi, y A. Lanzavecchia.** 1999. The role of dendritic cells in T cell priming: the importance of being professional. En Dendritic cells. T.L. Lotze y A.W. Thomson, editors. *Academic Press*, San Diego. 251-253.
- 35 58. **Vremec, D., y K. Shortman.** 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of Immunology* 159, no. 2:565-73.
- 40 59. **Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, y K. Shortman.** 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 176, no. 1: 47-58.
- 45 60. **Weiss, A.A., E.L. Hewlett, G.A. Myers, y S. Falkow.** 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Journal of Infectious Diseases* 150, no. 2: 219-22.
61. **Weiss, A.A., y M.S. Goodwin.** 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infection & Immunity* 57, no. 12: 3757-64.
- 50 62. **Wolff, J., G.H. Cook, A.R. Goldhammer, y S.A. Berkowitz.** 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, no. 7:3841-4.
- 55 64. **Zhong, G., C.R. Sousa, y R.N. Germain.** 1997. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure *in vivo* or *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 5:673-82.
- 60 65. **Zinkernagel, R.M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, y H. Hengartner.** 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunological Reviews* 156: 199-209.
- 65 66. **Betsou et al. Infect. Immun.** 1993 Sept., 61(9) 3583-3589.
67. **Betsou et al. Infect. Immun.** 1995 Sept., 63(9) 3309-3315.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector proteínico que comprende una forma no tóxica de adenilciclase de la especie *Bordetella* y un antígeno o epítipo acoplado químicamente a dicha adenilciclase de la especie *Bordetella*, en el que dicho epítipo o antígeno está acoplado a un residuo único de cisteína insertado genéticamente ubicado en el interior del dominio catalítico de dicha adenilciclase.
- 10 2. Vector proteínico según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo es un epítipo que inicia una respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas.
3. Vector proteínico según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo es un epítipo que inicia una respuesta de las células CD4<sup>+</sup>.
- 15 4. Vector proteínico según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno se selecciona de entre el grupo constituido por un antígeno celular bacteriano intracelular, un antígeno celular tumoral, un antígeno viral, un antígeno fúngico o un antígeno celular parasitario.
- 20 5. Vector proteínico según la reivindicación 4, en el que dicho antígeno se selecciona de entre el grupo constituido por un antígeno de poliovirus, un antígeno del virus VIH, un antígeno del virus de la influenza, un epítipo del virus de la coriomeningitis, un antígeno tumoral.
- 25 6. Vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha adenilciclase de la especie *Bordetella* es una adenilciclase recombinante.
7. Vector proteínico según la reivindicación 6, en el que dicha adenilciclase de *Bordetella* recombinante se modifica genéticamente además mediante mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, con la condición de que los dominios necesarios para la unión a las células que expresan CD11b resulten todavía funcionales.
- 30 8. Vector proteínico según la reivindicación 7, en el que dicha adenilciclase modificada genéticamente es una forma no tóxica o destoxificada.
9. Vector proteínico según la reivindicación 7, en el que dicha adenilciclase modificada genéticamente es un fragmento de la toxina adenilciclase de *Bordetella* nativa, en el que dicho fragmento puede unir el receptor CD11b.
- 35 10. Vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la adenilciclase es de *Bordetella pertussis*.
- 40 11. Composición farmacéutica apropiada para la administración en un humano o en un animal, que se formula para dirigir una molécula de interés específicamente a las células que expresan CD11b, **caracterizada** porque comprende un vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Composición farmacéutica que comprende un vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización en la promoción de una respuesta inmune.
- 45 13. Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 11, para la preparación de una composición inmunoterapéutica para el tratamiento de cáncer, infecciones virales, infecciones parasitarias o infecciones bacterianas.
14. Composición inmunoterapéutica que comprende un vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización en el tratamiento de cáncer, infecciones virales, infecciones parasitarias o infecciones bacterianas.
- 50 15. Vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización en dirigir específicamente, dicho epítipo o antígeno a las células que expresan CD11b.
16. Vector proteínico según la reivindicación 15, en el que dicho epítipo o antígeno se dirige por lo menos a la superficie de las células que expresan CD11b.
- 55 17. Vector proteínico según la reivindicación 15, en el que dicho epítipo o antígeno se suministra al citosol de las células que expresan CD11b.
- 60 18. Vector proteínico según la reivindicación 15, en el que dicho epítipo o antígeno se suministra en la vía endocítica de las células que expresan CD11b.
19. Vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que dichas células que expresan CD11b son neutrófilos, macrófagos, células NK o células dendríticas, y más preferentemente células dendríticas mieloides.
- 65 20. Célula que expresa CD11b aislada, a la que un vector proteínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 se une.

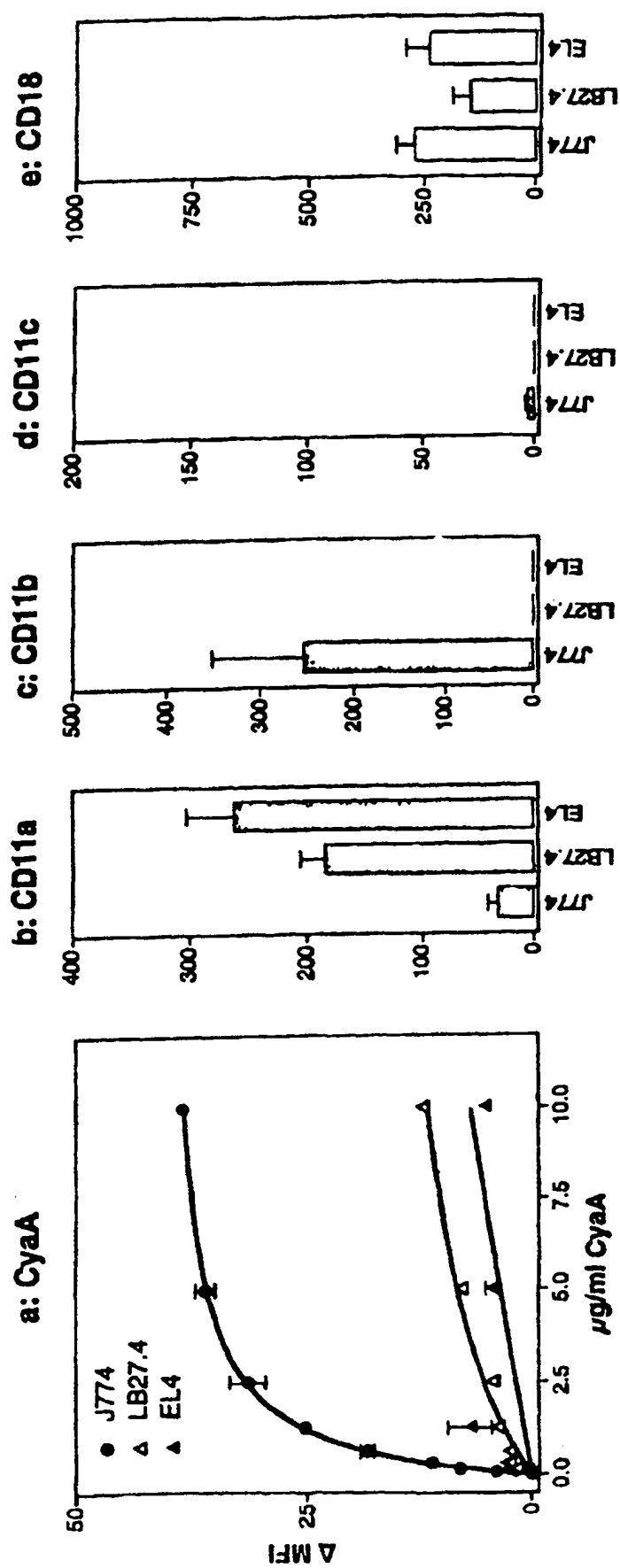


Figura 1

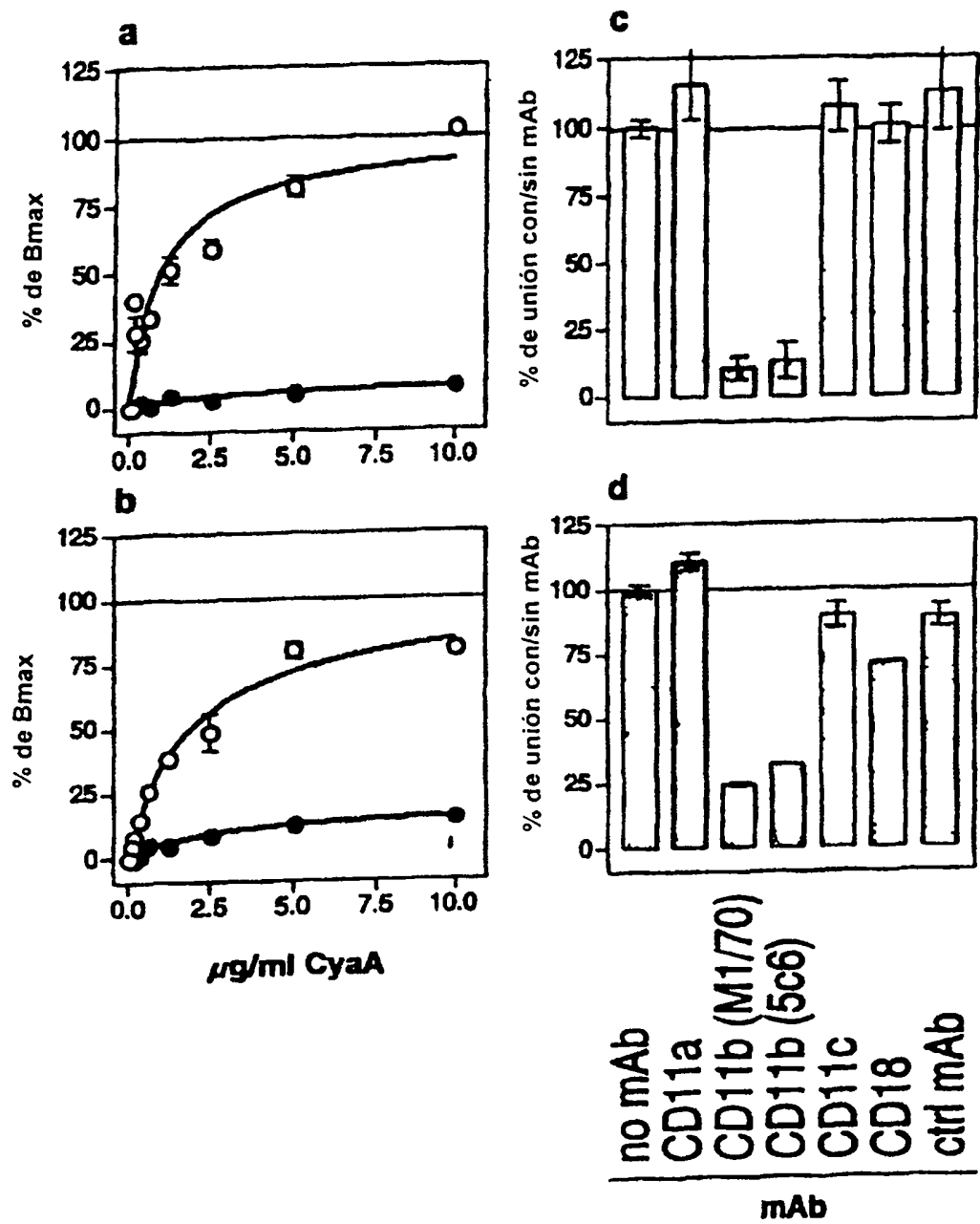


Figura 2



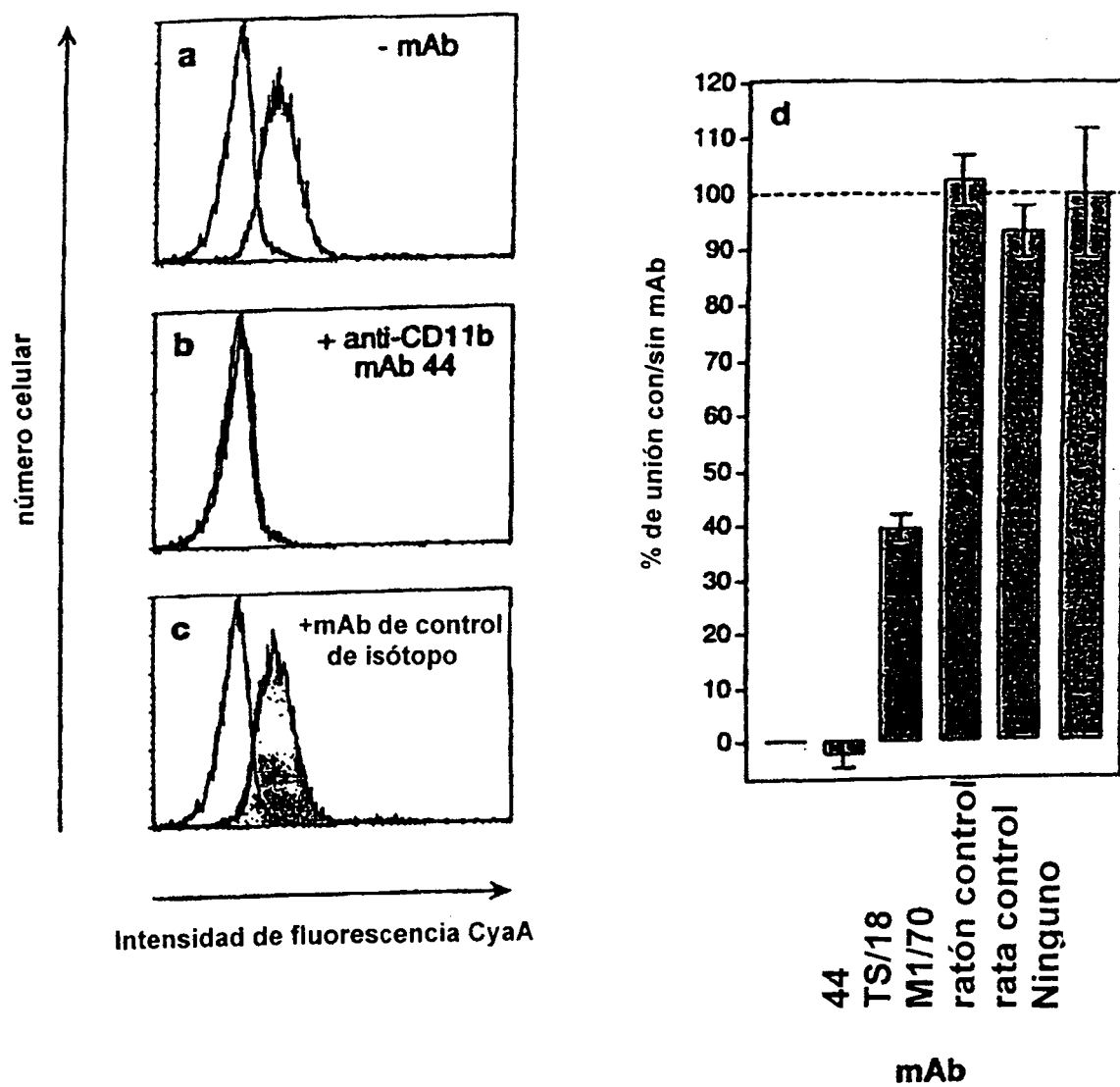


Figura 3

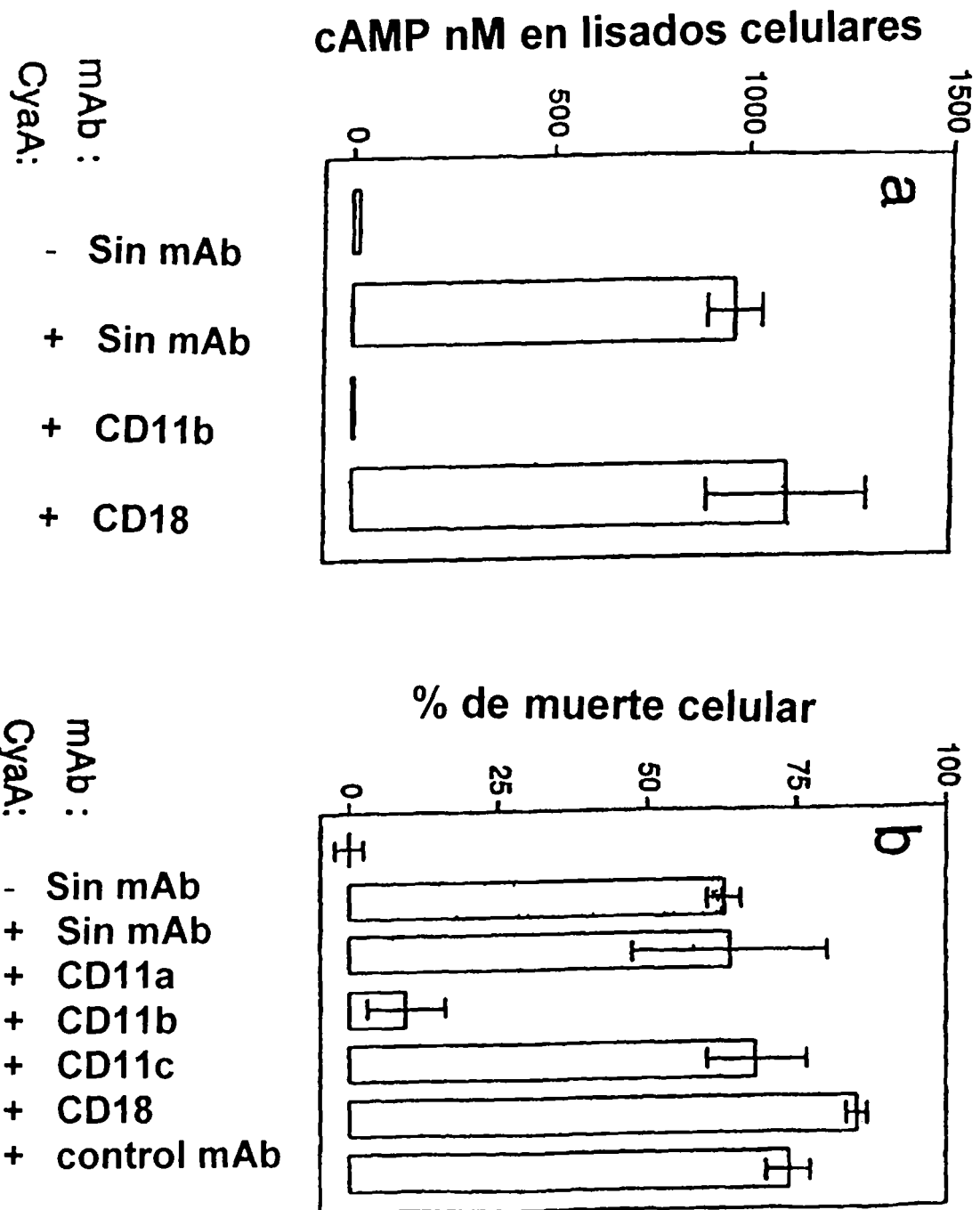


Figura 4

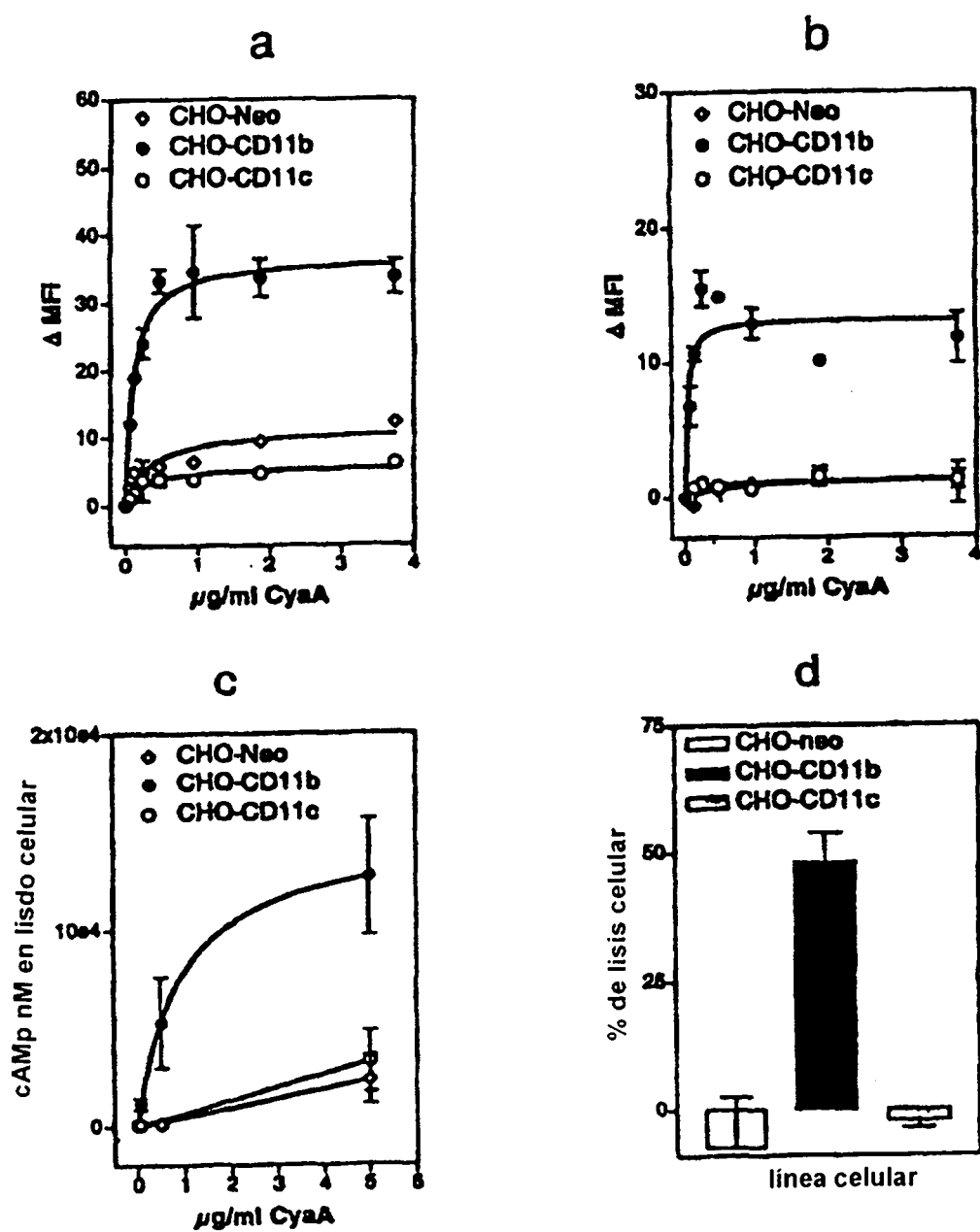


Figura 5

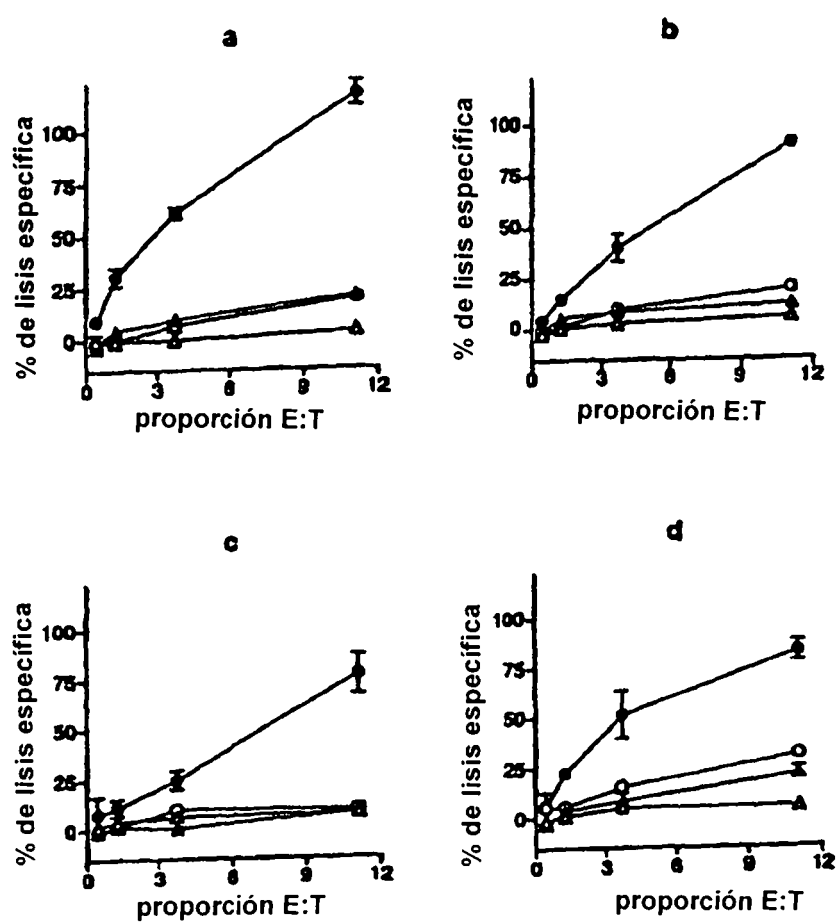


Figura 6

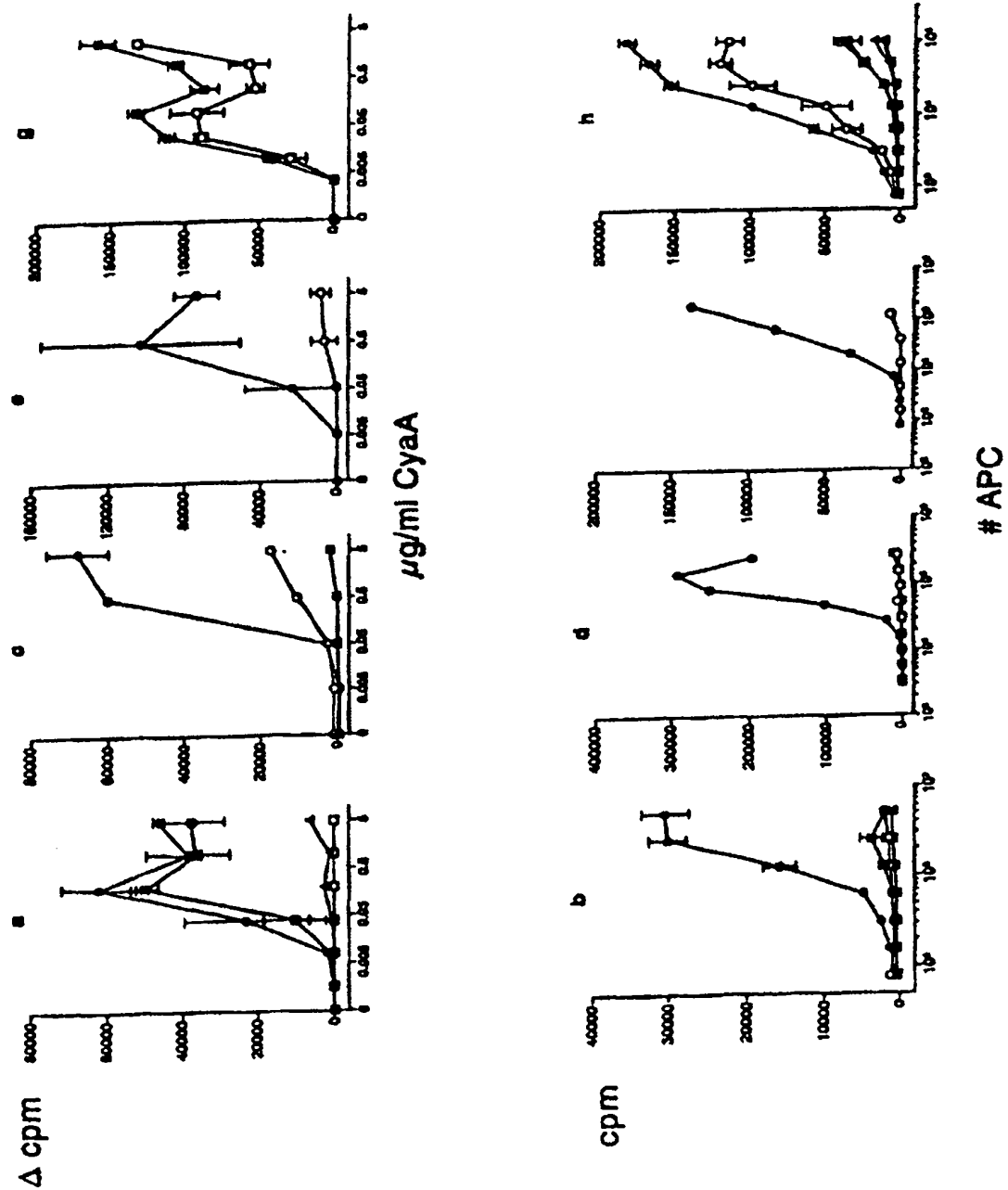


Figura 7

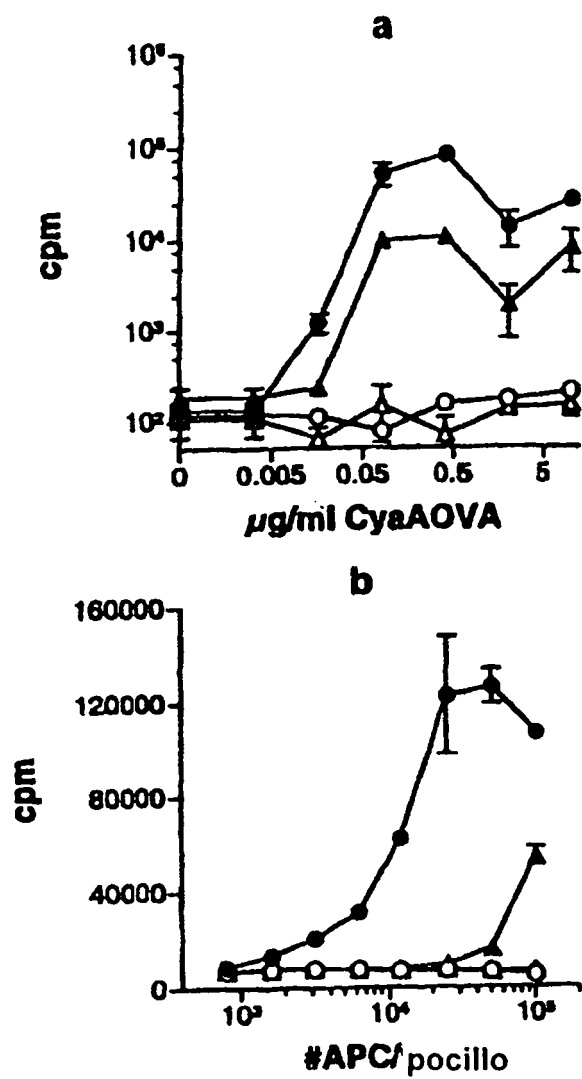
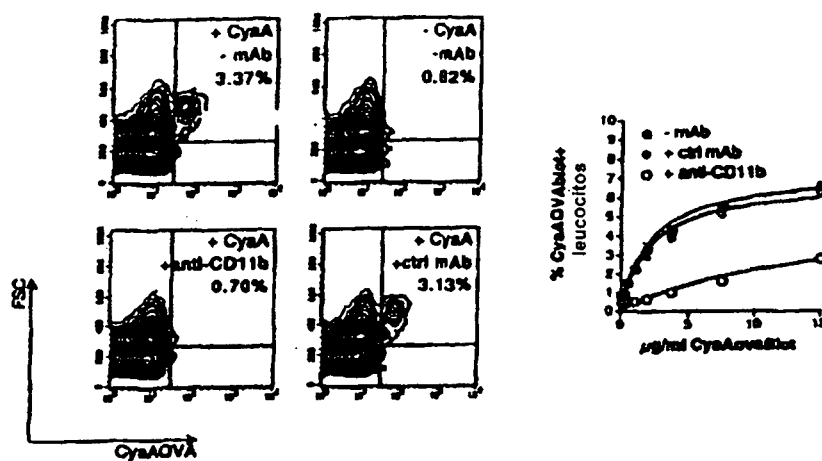


Figura 8

a



b

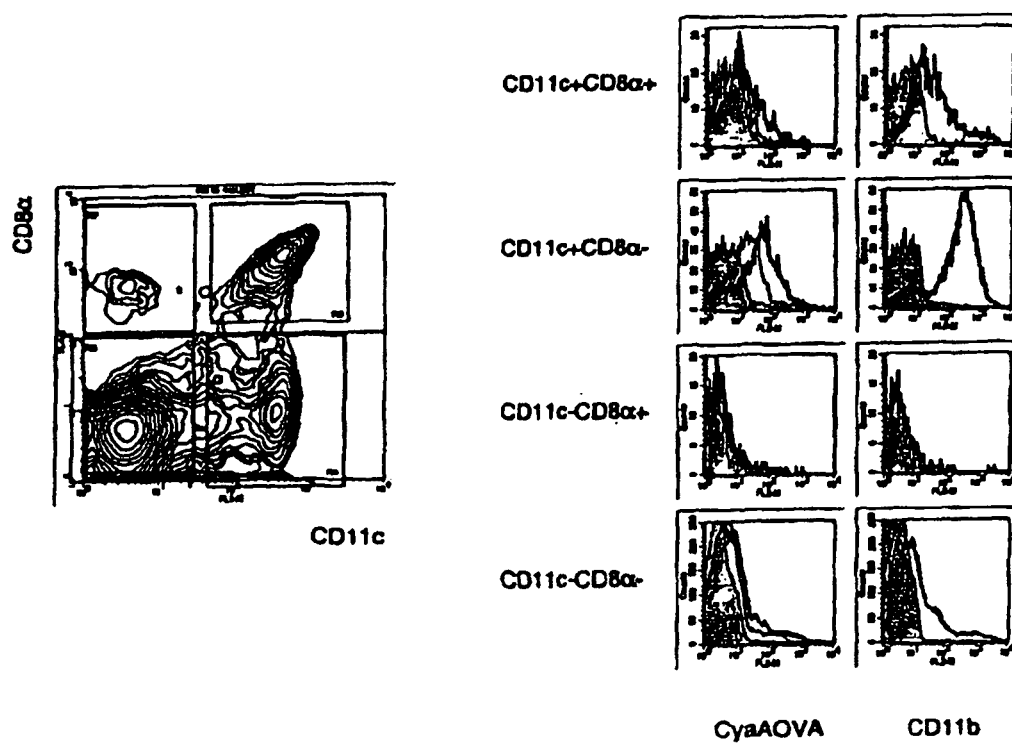


Figura 9

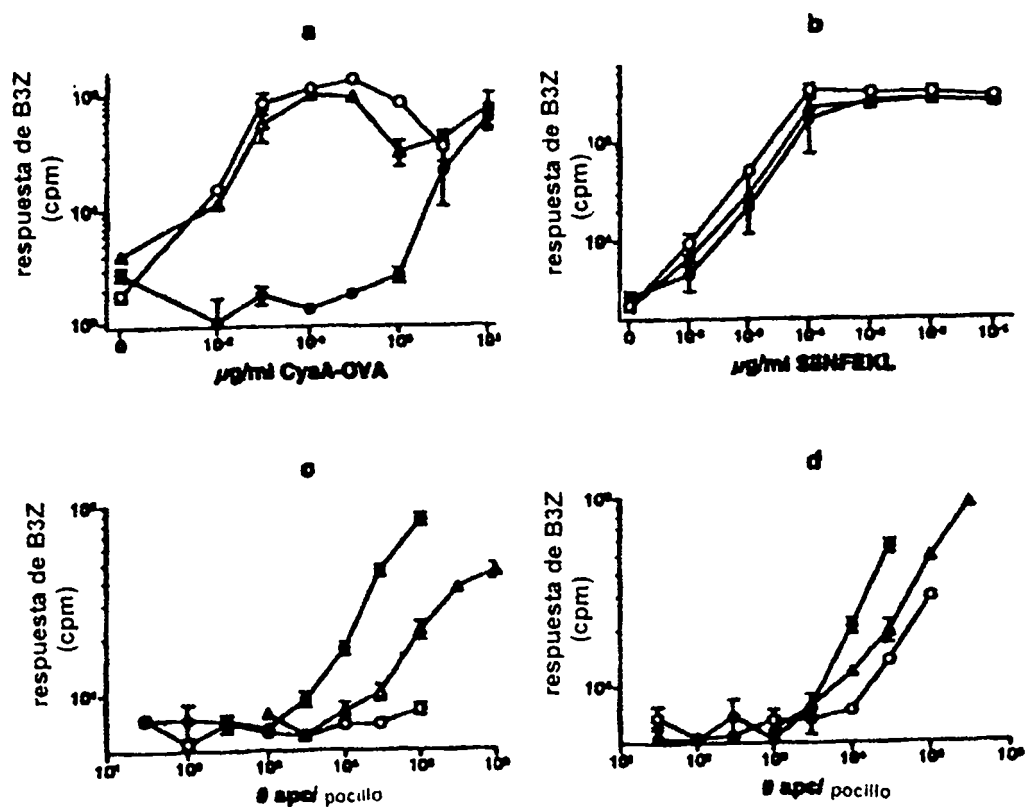


Figura 10