



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 580**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98947128 .9**
86 Fecha de presentación : **15.09.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1024836**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2000**

54 Título: **Composiciones para administrar genes a células de la piel que presentan antígenos.**

30 Prioridad: **15.09.1997 US 58933 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **Genetic Immunity, L.L.C.**
8300 Greensboro Drive
McLean, Virginia 22102, US

72 Inventor/es: **Liszewicz, Julianna y**
Lori, Franco

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 279 580 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para administrar genes a células de la piel que presentan antígenos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a composiciones para suministrar material genético extraño a las células. En particular, se refiere a una técnica para el suministro de genes, mediado por receptores, a las células. Un complejo de suministro génico, compatible con un tipo específico de célula diana, se forma a partir del material genético extraño, un vector, y opcionalmente un vehículo. El complejo se expone entonces a las células en condiciones que permitan la endocitosis mediada por receptores, dando como resultado la captación funcional, o transducción, del material genético extraño. Los complejos no sólo son útiles para el suministro génico *in vitro*, sino también *in vivo*, a células que presentan antígenos, específicamente descrito como transferencia génica transcutánea a células de Langerhans de la piel. Esta técnica es particularmente útil para la inmunización genética preventiva y terapéutica cuando el material genético extraño es un inmunógeno tal como ADN que codifica una porción sustancial de los antígenos y partículas asociadas con un virus infeccioso, y cuando es indeseable el suministro mediante inyección.

Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario de los animales tiene dos respuestas diferentes pero relacionadas, la respuesta inmunitaria celular y la respuesta inmunitaria humoral. La respuesta inmunitaria celular produce linfocitos T que exterminan células que tienen marcadores de identificación extraños sobre su superficie. Se afirma que las células que tienen tales marcadores de identificación sobre su superficie “presentan” un antígeno, y se denominan como células que presentan antígenos (APC). Además, los linfocitos T también estimulan la respuesta humoral ayudando a las células B, los precursores de las células del plasma.

La respuesta inmunitaria humoral da como resultado la producción, por las células del plasma, de anticuerpos que actúan sobre moléculas específicas en disolución. Los anticuerpos (o inmunoglobulinas) son proteínas sintetizadas por un animal en respuesta a la presencia de una sustancia extraña. Son segregados por células del plasma, que derivan de linfocitos B (células B). Estas proteínas solubles son los elementos de reconocimiento de la respuesta inmunitaria humoral. Cada anticuerpo tiene una afinidad específica por la sustancia extraña que estimula su síntesis. Esto es, el anticuerpo tiene un segmento o sitio, denominado un sitio de unión a antígeno, que se adherirá a la sustancia extraña. Una macromolécula extraña, capaz de provocar la formación de anticuerpos contra ella misma, se denomina antígeno. Habitualmente, las proteínas y polisacáridos son antígenos eficaces. La afinidad específica de un anticuerpo no es para todo el antígeno macromolecular, sino para un sitio particular en él, denominado el determinante o epítipo antigénico. Los anticuerpos reconocen moléculas extrañas en disolución y en membranas, independientemente del contexto de la molécula. La respuesta inmunitaria humoral es la más eficaz combatiendo bacterias y virus en medios extracelulares (la palabra humor es la palabra latina para fluido o líquido). Una estrategia para conferir inmunidad contra una enfermedad es exponer al individuo a uno o más antígenos asociados con un virus o bacteria, en lugar de usar el virus o bacteria real. Tal vacuna se conoce como vacuna subunitaria, y funciona particularmente bien para estimular la producción de anticuerpos.

Las células T median la respuesta inmunitaria celular. Contrariamente a la respuesta inmunitaria humoral, la respuesta inmunitaria celular destruye las células infectadas por el virus, destruye parásitos, y destruye células cancerígenas. La superficie de las células T contiene proteínas transmembránicas denominadas receptores de células T que reconocen moléculas extrañas sobre la superficie de otras células. Esto es, las células T reconocen células que presentan antígenos (APC). Los receptores de células T no reconocen moléculas extrañas aisladas. La unidad extraña debe de estar localizada sobre la superficie de una célula, y debe ser presentada a la célula T mediante una proteína membránica particular, una codificada por una región cromosómica muy variable del hospedante, conocida como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC codifica tres clases de proteínas transmembránicas. Las proteínas de MHC de clase I, que se expresan en casi todos los tipos de células, presentan epítopos extraños a células T citotóxicas. Las proteínas de MHC de clase II, que se expresan en células del sistema inmunitario y en fagocitos, presentan epítopos extraños a células T auxiliares. Las proteínas de MHC de clase III son componentes del proceso conocido como la cascada del complemento.

Existe una variedad de células T, incluyendo linfocitos T citotóxicos (CTL, o células T exterminadoras) que destruyen células que presentan un epítipo extraño unido a una proteína de MHC. Cuando el epítipo extraño más la proteína de MHC se unen al receptor de células T, la célula T segrega gránulos que contienen perforina, que se polimerizan para formar poros transmembránicos, rompiendo de ese modo la abertura celular, o induciendo la lisis celular. Otras clases de células T, denominadas células T auxiliares, segregan péptidos y proteínas denominados linfoquinas. Estas moléculas similares a hormonas dirigen los movimientos y actividades de otras células. Algunos ejemplos son interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interferones, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y factor de necrosis tumoral (TNF). Las células T están implicadas en la cascada de complemento, una serie compleja, regulada de forma precisa, de sucesos que dan como resultado la destrucción de microorganismos y de células infectadas. Más de quince proteínas solubles cooperan para formar complejos de antígenos-anticuerpos multiunitarios que preceden a la formación de grandes orificios en la membrana plasmática de las células.

Se puede usar la expresión de genes extraños en células que presentan antígenos (APC) para generar una respuesta de CTL eficaz en animales. Por lo tanto, la transferencia génica y la modificación genética de APC tiene un potencial para generar una vacuna eficaz y enfoques terapéuticos contra diferentes enfermedades, incluyendo infecciones víricas y cáncer. Los vectores de virus recombinantes vivos que expresan diversos antígenos extraños, tales como los virus que provocan enfermedades eruptivas, los adenovirus, y los retrovirus, se pueden usar para provocar una respuesta inmunitaria tanto humoral como celular imitando la infección vírica. También, se han propuesto como vacunas los virus atenuados vivos (o debilitados). También se está explorando la estrategia de vacunación con ADN. Se han clonado diferentes genes víricos en ADN plasmídico, y se han inyectado en músculos, piel, o subcutáneamente. Estos constructos son capaces de expresar proteínas y provocar una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral.

Se ha sugerido que las enfermedades víricas pueden ser sensibles a la técnica de inmunización genética. Se sabe que ciertas células, tales como las células dendríticas, recogen antígenos y migran desde los tejidos del organismo hasta los tejidos linfoides. Allí, estas células presentan los antígenos en los órganos linfoides: esto es, presentan un epítipo extraño unido a una proteína de MHC. Tales células que presentan antígenos (APC) son una parte conocida del mecanismo de respuesta inmunitaria. Si se modifican células tales como células dendríticas (DC) de forma que contengan ADN que codifica un virus que es infeccioso pero que es incapaz de una reproducción eficaz, entonces podrían presentar no sólo antígenos en el sentido clásico, sino también se podrían manipular para producir, o expresar, partículas víricas y una amplia variedad de proteínas víricas. En el documento WO 97/31119 "Methods and Compositions for Protective and Therapeutic Genetic Immunization" se ha descrito una nueva tecnología. Se describe que los genes de un virus incompetente para la replicación se pueden incorporar en células que presentan antígenos que entonces migran hacia los órganos linfoides y producen el complemento completo de antígenos víricos y partículas víricas, disparando de ese modo las respuestas inmunitarias tanto humoral como celular. Se enseña que las DC en los órganos linfoides pueden expresar entonces todos los antígenos víricos y producir partículas víricas "que parecen auténticas". Por lo tanto, estas partículas víricas jugarían un papel de pivote en la generación de respuestas inmunitarias adicionales.

Esta referencia describe, en el Ejemplo 13, la "transducción *in vivo*" de células, incluyendo APC. En ese ejemplo, se ejemplifican varios métodos bien conocidos, incluyendo el suministro génico vírico y no vírico. En el Ejemplo 14, se describe la "transducción *in vivo*" de células, incluyendo APC. Estas transducciones utilizan (1) inyección directa de ADN; (2) inyección de liposomas o virosomas que contienen el ADN; (3) la inyección intraesplénica directa de poxvirus de clase 4; y (4) supositorios rectales y vaginales que portan los vehículos del suministro génico. Sin embargo, esta referencia no describe con detalle los métodos del suministro génico *in vitro* e *in vivo*. Ése es el objeto de la presente invención.

Hay algunos signos que sugieren que la modificación genética de APC será eficaz para vacunar animales y seres humanos neonatos y adultos. Ridge *et al.* (Science 271: 1723-1726, 1996) han inyectado, intravenosamente en ratones, DC que expresan un antígeno extraño aislado de otro animal. Los ratones tanto neonatos como adultos, inyectados con estas DC, fueron capaces de generar buenos CTL que matan a las células diana. Estos experimentos también demostraron que las DC, que expresan un antígeno extraño, pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora mediada por células que es capaz de eliminar células infectadas en caso de infecciones víricas. Además, estos experimentos demostraron que puede ser posible la inmunización de neonatos mediada por DC. Estos experimentos no usaron células genéticamente modificadas, ni utilizaron varios antígenos extraños ni un virus como se describe en la presente invención.

Sarzotti *et al.* (Science 271: 1726-128, 1996) demostró que la inoculación a dosis bajas con virus da como resultado una respuesta inmunitaria protectora (de tipo Th1) que genera una respuesta de CTL, pero la inoculación con dosis elevadas dará como resultado una respuesta inmunitaria no protectora (de tipo Th2) que genera principalmente anticuerpos. Estas respuestas de CTL duraron muchísimo, y también se pudieron generar en neonatos. Las dosis elevadas de virus pueden aplastar y desarmar a las células T antes de que las DC pudiesen activar las células T. Nuevamente, es importante la vía de administración, no a través de inyección sino a través de la presentación mediante DC. Estos hallazgos son consistentes con otros resultados que muestran que la exposición a virus en dosis bajas provoca predominantemente una respuesta inmunitaria de tipo celular (de tipo Th1). En macacos, un SIV a dosis bajas alentó la respuesta de tipo Th1 sin producción de anticuerpos, y protegió a los animales frente a la exposición de dosis elevadas (Clerici *et al.* AIDS 8: 1391-1395, 1994). En seres humanos, se demostraron resultados similares por Rowland-Jones *et al.* (Nature Med 1: 59-64, 1995). Nature Medicine, vol. 2, 1996 1122-8, describe la inmunización con ADN puro en la piel basándose en el suministro biológico de partículas de oro revestidas con ADN.

El proceso de modificación de células de forma que contengan material genético extraño se denomina transferencia, transfección o transducción génica. Ninguno de los documentos citados en la presente memoria han presentado signos de una transferencia génica eficaz a células que presentan antígenos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Como antecedentes para la transferencia génica en células que presentan antígenos, tales como DC, se han descrito varios métodos *in vitro* "poco eficaces", incluyendo la transferencia génica mediada por liposomas; la electroporación y las transferencias génicas mediadas por vectores retrovíricos y vectores adenovíricos (Arthur, J.F *et al.* Cancer Gene Therapy. 4:1 17-21, 1997, Song, E. S. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 94:5, 1943-8, 1997). Todos estos métodos *in vitro* implican el aislamiento de grandes poblaciones de células que se tratan en el laboratorio con el vehículo de suministro génico. Todas las aplicaciones humanas o animales implican la reintroducción de estas células modificadas genéticamente. Por lo tanto, los métodos de suministro génico *in vitro* no son factibles para la vacunación o el tratamiento de grandes números de individuos. Los métodos *in vivo* conocidos incluyen la inyección intradérmica o intramuscular de vectores

víricos recombinantes, y la inyección intradérmica, subcutánea e intramuscular de ADN plasmídico. Ninguno de estos métodos ha demostrado suministrar eficazmente genes a células que presentan antígenos, tales como células dendríticas, y muchos menos el suministro de genes a través de la piel en las células de Langerhans.

5 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra el suministro génico mediado por anticuerpos a células que expresan receptores de Fc.

La Fig. 2 ilustra el suministro génico a células dendríticas y células de Langerhans vía el receptor de manosa usando el complejo de PEI-man-ADN.

La Fig. 3 ilustra el enfoque de suministro génico transcutáneo.

La Fig. 4 compara la eficacia de la transfección *in vitro* de DC humanas usando dos complejos diferentes de la presente invención.

La Fig. 5 el ensayo de CTL ilustra que las DC transducidas son capaces de generar células T citotóxicas a partir de células T no tratadas anteriormente: compara el % de citotoxicidad de DC transfectadas con el plásmido de integrasa-VIH con la de las DC del control.

La Fig. 6 ilustra la respuesta de CTL tras la inmunización genética *ex vivo*: compara la respuesta de CTL obtenida *in vivo* usando DC transfectadas.

25 Descripción detallada de los dibujos

En la Fig. 1, se ilustra conceptualmente el proceso del suministro génico, mediado por anticuerpos, en células que expresan receptores de Fc. Las células diana (1), que tienen uno o más receptores (2 a, b, c, d), se exponen a un complejo (3) de suministro génico que comprende un vehículo (4) y un vector (5) que incluye el material genético extraño. El complejo (3) de suministro génico se une a los receptores (2 a, b, c, d) de la célula (1), y el vector (4) se incorpora en la célula vía endocitosis o fagocitosis en un endosoma (6). El vector (4) tiene la propiedades de romper el endosoma (6), permitiendo que se libere en la célula el material genético extraño.

En la Fig. 2, se ilustra conceptualmente el proceso del suministro génico, mediado por azúcares, en las células que expresan receptores de manosa. Las células diana (10) en este caso células inmaduras de Langerhans que tienen uno o más receptores de manosa (12), se exponen a un complejo (13) de suministro génico que comprende un azúcar polietilénimínico (manosa) complejado con el material genético extraño. El complejo (13) de suministro génico se une a los receptores (12) de la célula (10), y el PEI-man-ADN se incorpora en la célula vía endocitosis en un endosoma (14). El vector (PEI-man) tiene la propiedad de romper (15) el endosoma, permitiendo que se libere en la célula el material genético extraño. La célula madura (16) y expresa proteínas (17) codificadas por el material genético extraño.

En la Fig. 3, se ilustra el experimento que demuestra el suministro génico *in vivo*, mediado por azúcares, en las células que expresan receptores de manosa. Las células diana son células de Langerhans en la piel, que se sabe que expresan receptores de manosa. Se anestesiaron ratones (21), y se depiló un área en la espalda de cada ratón (22). La superficie depilada se limpió con etanol. Se aplicó el complejo de suministro génico de PEI-man-ADN en 8% de glucosa (23) al área depilada (22) de cada ratón. Las células de Langerhans (24) encontradas en el área depilada de la piel (22) recogieron el complejo como se describió en la Fig. 2 anterior, se activaron y migraron (24) a los ganglios linfáticos de drenaje (25). Durante la migración, las células de Langerhans (24) maduran para convertirse en células dendríticas (26), y expresan la proteína (27) codificada por el ADN.

En la Fig. 4, se presentan los resultados experimentales que demuestran el suministro génico *in vitro* con los complejos de PEI-ADN frente a PEI-man-ADN. Se cultivaron DC humanas como se describió en el texto, y se transfectaron con los complejos. Como ADN, se usó un gen marcador que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). En estos experimentos, los complejos se disolvieron en una disolución de NaCl. El experimento demostró que PEI-man es más eficaz, para transfectar DC cultivadas, que PEI.

Las Figs. 5-6 dan a conocer resultados experimentales, y se tratan en detalle en la sección de Ejemplos descritos a continuación.

60 Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un medio de eficacia mejorada de transferencia génica a las células, *in vitro* e *in vivo*. Un objetivo adicional de la invención consiste en proporcionar un medio mejorado de inmunización genética aumentando la eficacia de la transferencia génica a células que presentan antígenos. Es aún otro objetivo adicional de la presente invención proporcionar un medio para estimular las respuestas inmunitarias tanto humoral como celular frente al producto proteínico del material genético transfectado. Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar una respuesta inmunitaria eficaz frente a enfermedades víricas. Todavía otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una vacuna para enfermedades víricas, que sea eficaz y que tenga una seguridad mejorada.

Una ventaja de la presente invención es que proporciona medios para la transferencia génica *in vivo* que se puede utilizar para inmunoterapia y vacunación para una amplia variedad de enfermedades.

Otra ventaja de la presente invención es que puede utilizar cualquier tipo de ADN, o ARN, incluyendo ADN plasmídico, que codifica inmunógenos como oncogenes, inmunogenes (que causan alergia), proteínas víricas o diferentes tipos de virus defectuosos para la replicación, partículas víricas defectuosas, así como ADN plasmídico.

Estos y otros objetivos y ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a través de la presente descripción y de los ejemplos descritos en la presente memoria.

Los objetivos y ventajas de la presente invención se logran formando un complejo de suministro génico que comprende un vector (que contiene el material genético extraño deseado) y un portador (que se puede unir tanto a las células como a la partícula de suministro génico), exponiendo entonces las células diana al complejo, en condiciones que permitan la endocitosis. El vector tiene la característica de que permite que el material genético escape de la degradación endosómica, y suministra el material genético extraño deseado al citoplasma o al núcleo. Las proteínas extrañas se pueden expresar y presentar al sistema inmunitario mediante las células genéticamente modificadas. Si el material genético extraño codifica un virus defectuoso para la replicación, como se describe en el documento WO 97/31119 "Methods and Compositions for Protective and Therapeutic Genetic Immunization", las células diana alteradas pueden presentar entonces antígenos víricos, y también expresan partículas víricas y proteínas en los órganos linfoides, generando de ese modo una respuesta inmunitaria celular eficaz, así como una respuesta inmunitaria humoral.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en particular a medios y composiciones para el suministro de material genético extraño en las células. Particularmente, es útil para potenciar la eficacia de la inmunización genética aumentando la eficacia de la transferencia génica a ciertas células que participan en el sistema inmunitario, tales como las células que presentan antígenos (APC).

La presente invención utiliza algunas de las vías naturales disponibles en animales.

Se sabe, por ejemplo, que se importan proteínas específicas hacia el interior de las células mediante un proceso denominado endocitosis mediada por receptor. En este proceso, las proteínas específicas, o ligandos, se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de una célula. La membrana forma una vesícula, o un bolsillo, alrededor de la proteína, y eventualmente interna el ligando. Esto es, importa la proteína hacia el interior de la célula. Después, el endosoma suministra típicamente estos complejos a un lisosoma, en el que son digeridos en sus partes componentes, los péptidos. En las células en las que se produce la expresión de MHC, se acumulan los complejos de péptido-MHC en el lisosoma, y después alcanzan la superficie de la célula en un proceso denominado presentación del antígeno. La endocitosis mediada por receptor es el medio para suministrar moléculas grandes, tales como metabolitos esenciales, hormonas y factores de crecimiento, a las células. Es una vía explotada por muchos virus y toxinas para entrar en las células, y también desempeñan una parte en la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, las células fagocíticas tienen receptores que les permiten captar complejos de antígeno-anticuerpo.

Las partículas complejadas con anticuerpos tales como IgG, o con complementos tales como C3b, o con ambos, pueden entrar eficazmente en las células a través de la endocitosis mediada por receptor y a través de la fagocitosis. Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, tienen porciones diferentes que les permiten realizar funciones diferentes. Por ejemplo, la inmunoglobulina G (IgG) es una molécula con forma de Y, con dos segmentos de F_{ab} que tienen sitios de unión a antígenos, y un segmento de F_c que media funciones efectoras. Los antígenos multivalentes se pueden unir a anticuerpos y formar complejos inmunitarios. El tamaño de estos complejos inmunitarios es función de la concentración relativa de antígeno y de anticuerpo.

La endocitosis se puede potenciar mediante un proceso conocido como opsonización. La opsonización es un proceso mediante el cual los anticuerpos recubren a los antígenos, proporcionando de ese modo un medio para que los otros componentes del sistema inmunitario reconozcan y respondan a los antígenos. Las inmunoglobulinas con los sitios F_{ab} apropiados se pueden usar para revestir las partículas antigénicas, y, subsiguientemente, las células que expresan los receptores de F_c correspondientes pueden reconocer la parte de F_c de los antígenos opsonizados, y someterlos fácilmente a endocitosis. Los complementos tales como C3b, C4b y C3bi también tienen actividad de opsonización. Los complejos inmunitarios más grandes son fagocitados de forma más eficaz que los pequeños por células tales como células B, fagocitos mononucleares, granulocitos, neutrófilos y células dendríticas que expresan receptores para las porciones de F_c de las moléculas inmunoglobulínicas.

Los anticuerpos IgG se pueden obtener en animales inyectando el antígeno con o sin adyuvantes. También, los anticuerpos se pueden clonar y humanizar usando técnicas de genética molecular. Otros receptores que están localizados habitualmente sobre las membranas de las células del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, receptores de transferrina, de manosa y de asialoglicoproteínas, que se podrían usar fácilmente para la transducción de células del sistema inmunitario. La parte del receptor de F_c del anticuerpo también se podría sustituir por otros dominios de unión a receptor, usando técnicas de genética molecular. Para los fines de la presente invención, son convenientes los receptores de F_c y las moléculas de IgG correspondientes, puesto que estos sirven para la función adicional de transportar genes a células dendríticas.

Una vez que una molécula o partícula es captada hacia el interior de una célula vía endocitosis o fagocitosis, ésta está contenida en un complejo de proteína-receptor denominado endosoma. Los endosomas son compartimientos ácidos intracelulares que sirven como una función de clasificación. Los fagosomas, que resultan de la fagocitosis, son endosomas grandes (10x-20x). Los endosomas se fusionan entonces con lisosomas en los que el material se digiere hasta productos más pequeños, tales como péptidos, nucleótidos y azúcares. En la presente invención, el papel del vector es proporcionar el gen extraño a la célula, y evitar la degradación del gen. Esto es, el vector debe de ser capaz de romper el endosoma y liberar el gen en el fluido intracelular, el citosol, o en el núcleo. Se conoce un gran número de partículas que son capaces de romper el endosoma tras la endocitosis mediada por receptor, incluyendo partículas víricas de suministro génico tales como vectores adenovíricos, vectores retrovíricos, vectores poxvíricos, y el virus SV-40. Las partículas no víricas de suministro génico incluyen conjugados de ADN con polilisina, polietilenimina y sus derivados, liposomas, virosomas y compuestos químicos que aumentan el pH en el endosoma, tal como cloroquina.

Células diana

La presente invención se puede usar con cualquier célula capaz de una endocitosis mediada por receptor, o de una fagocitosis. Las células diana deben de expresar un sitio del receptor que, con la unión a una molécula complementaria, pueda llevar a la molécula deseada hacia el interior del endosoma o del fagosoma. Para el fin de la presente invención, tales células son preferiblemente células que participan en la respuesta inmunitaria. Éstas incluyen células que se pueden incorporar en la endocitosis mediada por receptor y en la fagocitosis de antígenos. Tales células incluyen, por ejemplo, células B, fagocitos mononucleares, granulocitos y células dendríticas. Estas células expresan receptores para la porción de F_c de inmunoglobulinas o receptores del complemento, o de ambos. Se prefieren particularmente las células dendríticas y los macrófagos, debido a que pueden presentar eficazmente antígenos extraños, provocando de ese modo la respuesta inmunitaria celular, o respuesta CTL. Las células también se pueden seleccionar como dianas a través de otros receptores, tales como los receptores de transferrina y de manosa.

Las células dendríticas residen en los tejidos linfoides, tales como el bazo, amígdalas y ganglios linfáticos, pero también se pueden encontrar en la sangre, la epidermis, la mucosa, y otros tejidos periféricos. Estas células recogen antígenos y migran con los antígenos a los tejidos linfoides. En la piel, las células dendríticas, denominadas células de Langerhans, se pueden encontrar en la epidermis. Cuando endocitosan un antígeno, migran hacia el interior de ganglios linfáticos regionales. En el ganglio linfático, se denominan células interdigitantes, y presentan el antígeno a células T no expuestas previamente, provocando la respuesta inmunitaria celular.

Para incrementar la eficacia de la transferencia génica, se debería de maximizar el número de células dendríticas disponibles. La elección de la localización puede ser un factor. Concentraciones elevadas de células dendríticas se encuentran, por ejemplo, en la piel y en la mucosa, tal como la boca, la vagina y el recto. Las DC inmaduras en los tejidos se pueden endocitar eficazmente, y por lo tanto son una buena diana para el complejo de suministro génico que suministra genes con endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, para la expresión eficaz de moléculas del MHC y para la presentación del antígeno, las DC deben de estar activadas. Las DC inmaduras, *in vitro*, se pueden generar a partir de sangre periférica con GM-CSF e IL-4, o a partir de precursores de la médula ósea con GM-CSF. La activación de estas DC inmaduras se puede inducir *in vitro* e *in vivo* mediante productos bacterianos tales como lipopolisacárido y TNF-alfa (Watts C. Nature 338: 724-725, 1997).

Las células dendríticas se pueden ver atraídas hacia una localización específica, y se pueden activar mediante un suceso que implica al sistema inmunitario tal como una lesión celular o tisular. Para el presente fin, la atracción y activación de células que presentan antígenos, incluyendo células dendríticas, pueden estar mediadas por una respuesta inmunitaria no relacionada con la vacunación ni con la infección vírica. Un ejemplo sería el exantema que es el resultado de la sensibilidad de contacto a productos químicos tales como fármacos y toxinas, productos cosméticos y antígenos medioambientales. Si se hace pasar sobre la piel un irritante químico, habitualmente aparecerá un exantema o lesión 24-48 horas después de la exposición. La lesión es debida a neoantígenos creados mediante la unión de productos químicos a las proteínas de superficie de células de Langerhans. Los neoantígenos son proteínas "normales" (por ejemplo, fosforiladas), covalentemente modificadas, que son reconocidas por anticuerpos. En este sitio, se pueden encontrar cantidades mayores de las normales de células dendríticas, y es muy probable que estén activadas, esto es, sean más receptivas a la endocitosis inmediata de un antígeno. La elección de un irritante depende de su eficacia para atraer DC, y de sus efectos secundarios. En otra forma de realización de la invención, se puede crear una lesión mediada por el complejo inmunitario. En este caso, se pueden usar complejos inmunitarios tanto con componentes antigénicos como componentes de anticuerpos para activar las células B y la cascada del complemento, con la lesión tisular resultante.

Puesto que las células se seleccionan como dianas a través de una clase específica de receptores, una ventaja particular de la presente invención es que el complejo de suministro génico se puede obtener para identificar a células específicas como dianas. Si el complejo de suministro génico se obtiene con IgG o una polietilenimina modificada con un almidón o azúcar apropiado, será captado principalmente por células que presentan antígenos. Esto sería enormemente ventajoso en el desarrollo de vacunas a base de genes. También es posible como se describe anteriormente la selección como dianas de otras células que expresan, por ejemplo, receptores del complemento o receptores de transferrina.

Complejo de suministro génico

El complejo de suministro génico de la presente invención se puede usar para suministrar genes *in vitro* o *in vivo* a células que poseen un receptor dado. El complejo de suministro génico está formado por dos partes: el material genético y una partícula de suministro, y puede comprender además un portador (véase la Fig. 1). En una forma de realización, el material genético deriva de un virus de VIH atenuado, y la partícula de suministro es un vector no vírico.

El material genético

El material genético, ya sea ADN o ARN, es llevado por el complejo de suministro. Se pueden codificar uno o más genes en una cadena de ADN plasmídico, en ADN bicatenario o en ARN. Como alternativa, el material genético se puede construir en virus recombinantes si se usan como una partícula de suministro génico. Si el fin de la transferencia génica es inducir una respuesta inmunitaria, entonces el material genético debe de expresar una o más proteínas inmunógenas. Las células transducidas expresarán subsiguientemente una cantidad suficiente de las proteínas inmunógenas (diferentes antígenos víricos y producen suficientes partículas víricas auténticas) para provocar una respuesta inmunitaria suficiente (por ejemplo, proteger al individuo de una infección por el virus de tipo natural).

La elección de la partícula de suministro génico estará determinada por la enfermedad y por la elección del gen o genes a transferir. Cuando se desea construir una vacuna para un virus dependiente de la transcriptasa inversa, tal como VIH, el ADN codifica preferiblemente por lo menos una porción sustancial de un virus que presenta un defecto de replicación o de integración, o del propio virus que presenta un defecto de replicación o de integración. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a mutantes negativos a integrasa de un aislado primario con doble tropismo tal como VIH-1/LW, y sus derivados, que tienen una supresión en el sitio de escisión de proteasa del gen gag. Véase el documento WO 97/31119. Cuando se desee construir una vacuna para el cáncer, el inmunógeno es preferiblemente ADN que codifica uno o más oncogenes. Otros constructos de ADN pueden ser ADN que codifica el virus del papiloma humano que presenta un defecto de replicación (que provoca cáncer uterino), los virus de la hepatitis A, B y C defectuosos en la replicación (que provocan hepatitis y cáncer hepático), y ADN que codifica virus de animales defectuosos en la replicación, como el virus de la leucemia bobina o el virus de la inmunodeficiencia felina. Las elecciones para una partícula de suministro que incorpora el material genético extraño pueden incluir: (a) VIH que presenta un defecto de replicación, u otros retrovirus; (b) adenovirus recombinante; (c) ADN plasmídico o lineal o ARN complejo con PEI o un derivado de PEI; (d) un virosoma que contiene cualquier ADN o ARN; (e) liposoma que contiene ADN o ARN; (f) complejo de ADN plasmídico-polilisina-virus; (g) azúcar complejo con cualquier ADN o ARN.

El sistema de suministro

A fin de suministrar eficazmente los genes a la célula, el sistema de suministro génico debe de contener el gen o los genes a suministrar, y también debe de tener la capacidad para romper el endosoma (o fagosoma), en lugar de ser suministrado a un lisosoma o de ser aislado sobre la superficie externa de una célula y seleccionado para la destrucción. Además, el sistema de suministro génico debe de facilitar la incorporación del material genético extraño en el material genético de la célula.

El sistema de suministro génico es un vector no vírico. Los sistemas de suministro génico no víricos incluyen conjugados de ADN con azúcar, polilisina, polietilenimina, derivados de polietilenimina, y liposomas, junto con sus derivados.

Se prefieren los sistemas de suministro génico no víricos tales como aquellos que utilizan azúcares, derivados de azúcares, liposomas, derivados de liposomas y polietilenimina o derivados de polietilenimina. De estos, los más preferidos son el azúcar y los derivados de polietilenimina, adaptados para seleccionar como dianas a receptores de manosa de las células del sistema inmunitario.

Los sistemas de suministro génico no víricos ofrecen varias ventajas con respecto a los sistemas de suministro génico víricos: 1) en primer lugar, el vector no vírico no es reconocido por el sistema inmunitario, de forma que no se genera ninguna respuesta inmunitaria contra él. Como resultado, es muy probable que los individuos tratados con la vacuna final tolerarán y desarrollarán una respuesta inmunitaria adecuada en casos de inmunización repetida; 2) los sistemas no víricos son potencialmente más seguros que los sistemas víricos, debido a que no hay posibilidad de que el sistema mutará de manera inesperada; 3) los sistemas no víricos se pueden sintetizar químicamente en grandes cantidades, y por lo tanto son potencialmente más baratos.

La forma de realización preferida se basa en un polímero catiónico, polietilenimina (PEI). El PEI se une a ADN, y forma el complejo. El complejo de PEI-ADN puede entrar en el endosoma de las células de la piel que presentan antígeno, las células de Langerhans, vía endocitosis mediada por el receptor de asialoglicoproteína. Después, el componente de PEI de este complejo utiliza el tamponamiento y el hinchamiento del endosoma como un mecanismo de escape al citoplasma [Pollard H; Remy JS; Loussouarn G; Demolombe S; Behr JP; J Biol Chem 1998 Mar 27; 273 (13):7507-11]. El PEI también se puede modificar para seleccionar como dianas a otros receptores. Por ejemplo, un derivado de PEI, tal como un PEI modificado con azúcar, obtiene resultados similares, excepto que es captado a través del receptor de manosa de las células. Tales derivados se pueden obtener en el laboratorio. Por ejemplo, un derivado de isotiocianantofenil fenilmanosa se puede acoplar a PEI 25 kDa, produciendo un ligando (o un resto de manosa de baja afinidad por el receptor de manosa, 1 mM). Otra posibilidad es el uso de un ligando de manopentosa derivatizado

ES 2 279 580 T3

con PEI lineal de 22 kDa. (Estos materiales fueron suministrados generosamente por Jean-Paul Behr, Laboratoire de Chimie Genetique, Faculte de Pharmacie, CNRS-UMR 7514 74 route du Rhin 67401 Illkirch, Francia).

El receptor de manosa es una glicoproteína transmembránica de 175 kDa que se expresa específicamente sobre la superficie de macrófagos y de células de Langerhans. El ectodominio del receptor de manosa tiene ocho dominios de reconocimiento de hidratos de carbono. El receptor de manosa reconoce los patrones de azúcares que adornan a un amplio conjunto de bacterias, parásitos, levaduras, hongos, y ligandos manosilados. [Takahashi K; Donovan MJ; Rogers RA; Ezekowitz RA, Cell Tissue Res 1998 May; 292(2):311-23]. Contrariamente al receptor de F_c , el receptor de manosa se reconstituye a sí mismo mientras que libera su carga [Stahl *et al.* Cell 1980 19:207]. De este modo, puede internar ligandos en rondas sucesivas, de manera similar al receptor de transferrina, proporcionando una capacidad sostenida de captura de antígenos [Goldstein, *et al.*, 1985, Annu Rev Cell Biol. 1:1]. Se ha descubierto recientemente que la captación de antígenos mediada por el receptor de manosa da como resultado una presentación de antígenos más eficaz, de unas 100 veces, a las células T, en comparación con los antígenos internados vía una fase fluida [Engering *et al.* 1997, Eur. J. Immunol. 27: 2417-2425]. Esta presentación mejorada de antígenos es debida a la captación muy eficaz de antígenos vía el receptor de manosa. Por estas razones, se cree que la selección como diana del receptor de manosa puede proporcionar tanto una especificidad para células que presentan antígenos como una eficacia mejorada de la captación funcional del complejo en el endosoma.

El portador

El portador de la presente invención es la parte del complejo de suministro génico que une un sistema de suministro génico con un receptor celular. En una forma de realización, el portador es una inmunoglobulina G (IgG). La IgG es una molécula en forma de Y con dos segmentos de F_{ab} que tienen sitios de unión a antígenos, y un segmento de F_c que se une al receptor celular denominado receptor de F_c . Las células del sistema inmunitario, tales como las células B, los fagocitos mononucleares, los granulocitos y las células dendríticas, tienen receptores de F_c . Cuando se usa IgG como portador, selecciona específicamente como dianas a células que tienen receptores de F_c .

Para cambiar la especificidad del portador a fin de seleccionar a otras células como dianas, se puede sustituir la parte de F_c del anticuerpo por otros dominios de unión a receptor, tales como complemento, azúcar, o transferrina.

Cuando el portador es un anticuerpo, se forman grandes complejos, y el portador y el sistema de suministro génico se combinan preferiblemente en iguales proporciones. Cuando es deseable opsonizar la partícula, la cantidad del portador superará mucho la cantidad de partículas de suministro génico. En el caso de grandes complejos y de partículas opsonizadas, se potencian tanto la endocitosis como la fagocitosis. El complejo de suministro génico está opsonizado preferiblemente con el portador. Cuando se administra a un individuo un complejo de suministro génico opsonizado, formado por un anticuerpo complejo con una partícula de suministro que incorpora el material genético extraño, la respuesta inmunitaria celular se maximizará con respecto a la respuesta inmunitaria humoral. Las células dendríticas se activarán por los complejos opsonizados, y la endocitosis será más eficaz. También, los anticuerpos múltiples bloquearán los determinantes antigénicos (epítopos) de la partícula de suministro. Por lo tanto, no sería de esperar ninguna respuesta directa de anticuerpos a la partícula de suministro. También, algunos antígenos complejados a anticuerpos se unirán al sitio del receptor de F_c de las células B, inhibiendo adicionalmente su respuesta de anticuerpos. Sin embargo, la inmunidad celular se verá estimulada debido a que el complejo se verá sometido a endocitosis o a fagocitosis por diversos tipos de células que presentan antígenos, incluyendo células dendríticas y macrófagos.

En una forma de realización preferida, el portador está unido covalentemente al sistema de suministro génico no vírico. La PEI se puede modificar químicamente con azúcares (por ejemplo, manosa, glucosa, galactosa, etc.). En este caso, el portador es el ligando de azúcar, que es reconocido por el receptor de manosa. Para cambiar la especificidad del portador, el azúcar se puede sustituir por otros dominios de unión a receptores.

Suministro génico in vivo

El complejo de suministro génico se puede inyectar directamente en la sangre, en la piel, o en cualquier otro sitio en el que estén localizadas las células que corresponden a la especificidad de unión al portador. El complejo se puede aplicar directamente sobre las superficies de la piel o de las mucosas. En ese caso, es preferible que las células de Langerhans estén activadas en la superficie. La activación se puede lograr mediante estimulación del receptor (por ejemplo, el receptor de manosa), mediante activación con una toxina (toxina del cólera), mediante una lesión tisular o celular tal como inflamación, y puede ser la consecuencia de otra estimulación antigénica.

El complejo se puede infundir usando un tubo de alimentación pediátrico, de forma oral, vaginal o rectal, en el caso de adultos humanos o animales, o en el caso de neonatos. Los neonatos pueden responder a la administración oral mejor que los adultos. Como alternativa, el complejo de suministro génico se puede envasar en un supositorio, y se puede insertar en la vagina o en el recto.

Cuando se usa una partícula de suministro vírico, la partícula de suministro se puede inyectar directamente en el músculo o en la piel, en presencia o ausencia de adyuvantes, del sujeto en dos ocasiones separadas para un título elevado de producción de anticuerpos *in vivo*. La primera inyección dará como resultado principalmente una respuesta inmunitaria humoral. Esto es, se producirá la capacidad de producir números elevados de anticuerpos. Cuando exista una concentración de anticuerpos IgG suficiente para opsonizar las partículas de suministro, (se puede medir o evaluar

mediante experiencia) entonces la partícula de suministro se puede administrar una segunda vez como se describe en 1-3 más arriba. El sitio de la segunda administración se debe de escoger cuidadosamente para asegurarse de que estén presentes las células que pueden fagocitar o endocitar los antígenos opsonizados.

5 *Tratamiento de infección activa*

La vacuna de la presente invención también se puede usar como un método para tratar la infección por VIH activa. El VIH se replica abundantemente, muta rápidamente, de manera que, aunque el sistema inmune es capaz de montar una respuesta eficaz a un tipo dado de partícula de VIH, se producen nuevas variantes de la partícula en cantidades
10 suficientes para seguir en cabeza por delante del sistema inmunitario. Si la replicación del virus de tipo natural se puede suprimir antes de que el sistema inmunitario se vea sustancialmente dañado, o se puede suprimir de forma suficientemente prolongada para permitir que el sistema inmunitario se recupere, la vacuna de la presente invención se puede usar para fortalecer la capacidad del sistema inmunitario para reconocer las nuevas variantes del virus, proporcionando de ese modo un medio para controlar la replicación vírica en individuos que ya han sido infectados.

Se conocen combinaciones de fármacos que son eficaces para inhibir por lo menos temporalmente la replicación del VIH. Se ha demostrado que las combinaciones de fármacos que incluyen hidroxiurea, uno o más inhibidores de transcriptasa inversa y, opcionalmente, uno o más inhibidores de proteasas, son particularmente eficaces, y, para algunos pacientes, permiten que sea posible detener el tratamiento farmacéutico durante períodos prolongados de tiempo.
20 Véase el documento US 5.977.086 "Method of Inhibiting HIV by Combined Use of Hydroxyurea, a Nucleoside Analog, and a Protease Inhibitor". La presente invención incluye el tratamiento de un paciente con una infección por VIH activa con una combinación de fármacos apropiada hasta que la carga vírica en sangre haya alcanzado un nivel adecuadamente bajo, menor que alrededor de 50.000 copias por ml, preferiblemente menor que 10.000 copias por ml, más preferiblemente menor que 200-500 copias por ml. Entonces, el paciente es vacunado usando la presente invención,
25 mientras que la combinación de fármacos suprime la replicación del virus de tipo natural.

Los siguientes Ejemplos ilustran la presente invención.

Ejemplos

30

1. *Expresión de ADN plasmídico que codifica un VIH que presenta un defecto de replicación, en DC cultivadas*

Existen varias fuentes de DC. Las DC se pueden aislar de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de la médula ósea. Las células mononucleares de la médula ósea se separarán mediante centrifugación con gradiente de Ficoll-Hypaque. Estas células se seleccionarán positivamente con anticuerpos anti-DC34 humanos conjugados con perlas magnéticas (DynaL Detachabeads), y las células CD34+ se desplazarán de las perlas magnéticas usando un anticuerpo policlonal de elevada afinidad contra el anticuerpo monoclonal anti-CD34. Estas células se pueden diferenciar a DC cuando se cultivan con el factor de células madre, GM-CSF y TNF-alfa [Canque, B., M. Rosenzweig, *et al.* (1996). "The effect of *in vitro* human immunodeficiency virus infection on dendritic-cell differentiation and function". Blood
40 88(11): 4215-28].

Se generaron DC derivadas de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica en presencia de GM-CSF e IL-4. [Bender, A., M. Sapp, *et al.* (1996). "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood". J Immunol Methods 196(2): 121-35]. En el 4º día, las células se transfectaron con lipofectamina complejada con ADN plasmídico que codifica VIH-1/LWint- (un VIH que presenta un defecto de integración y de replicación, descrito en el documento WO 97/31119). La lipofectamina es un liposoma catiónico comercialmente disponible, útil como un reactivo de transfección (disponible de Gibco BRL Life Technology, PM. Gaithersburg, Md., US). Cuarenta y ocho horas más tarde, las células se lavaron y se analizaron. La pureza de las DC, caracterizada mediante un clasificador de células activadas mediante fluorescencia (FACS), que mide los marcadores de la superficie (FACS), fue 90,6%. Se encontró que los tipos de células DC eran CD3-, CD19-, CD56-, CD14- y HLA DR+ usando análisis mediante FACS. También se midió, mediante FACS, en células permeabilizadas, la expresión de las proteínas Gag y Env y Tat del VIH-1. El nivel de unión no específica de Ig de control isotópica fue el mismo en la transducida del control y en la transducida del plásmido específico. Se encontró en tres experimentos independientes que el 25-37% de DC transducidas con VIH-1/LWint- expresaron las proteínas Env, Gag y Tat. Esto es, el 25-37% de las células en las muestras transducidas expresaron las proteínas de VIH. Las muestras de las células transducidas y del control también se tiñeron doblemente con anticuerpos anti-p24 y anti-B7-2 para demostrar que las DC, y no los macrófagos, expresaban el antígeno. Estos resultados fueron sorprendentemente buenos, debido a que al usar los mismos métodos con otro ADN plasmídico (hemaglutinina del gen del virus de la gripe, y dirigida por CMV) sólo el 5-8% de las células transfectadas expresaron proteínas. Estos resultados demostraron que el VIH defectuoso se
60 puede expresar eficazmente mediante DC transducidas.

2. *ADN que codifica virus defectuosos en la replicación son antígenos más eficaces que el ADN que codifica una o más proteínas*

65 En un experimento independiente, se comparó la expresión de dos plásmidos de VIH diferentes en DC: VIH-1/LWint- y LTR-tat. Ambos constructos son accionados por el mismo promotor: VIH-1-LTR y la expresión de ambos constructos dependen de la transactivación de Tat. La transfección se realizó como se describe en el ejemplo 1, y se analizó la expresión de la proteína Tat 48 horas más tarde, mediante FACS. Se encontró que el 32% de las DC

transfectadas con el plásmido VIH-1/LWint- expresaron la proteína Tat. Por el contrario, sólo el 10% de las DC transfectadas con LTR-tat expresaron la misma proteína Tat. Este resultado fue sorprendente, debido a que en este estudio comparativo se esperaba la misma eficacia con los dos constructos diferentes. Los virus defectuosos en la replicación tienen definitivamente la capacidad para formar una partícula vírica, que se puede liberar a partir de la célula. Puesto que la presentación de antígenos depende de la expresión génica en DC, este experimento demuestra claramente que el ADN que codifica virus defectuosos con antígenos más eficaces que el ADN que codifica una o más proteínas.

3. DC transducidas y cultivadas activan *in vitro* CTL no expuesto previamente

Después de la transducción, las DC se cultivaron con células T autólogas, a una relación de 1:10. Después de 7 días, estas células T se usaron como un efector para lisar (exterminar) una población de células monocíticas/macrofágicas procedente del mismo donante que se había pulsado con p55, una proteína de VIH usada convenientemente como un marcador. Esta actividad de CTL se midió usando un ensayo de liberación de Cr. Como demuestra la Figura 5, los CTL inducidos por DC transducidas lisaron específica y efectivamente las células diana. Debido a que la generación de CTL *in vitro* es más difícil que *in vivo*, estos experimentos muestran que las células que se habían sometido a inmunización genética pueden activar CTL no expuestos previamente, de forma que lisarán eficazmente células infectadas *in vivo*. Además, el experimento demuestra adicionalmente que el ADN que codifica un virus defectuoso no sólo expresa genes de VIH eficazmente sino que también puede generar una respuesta inmunitaria eficaz.

4. Inmunización genética *ex vivo* con DC transducidas

Para demostrar la eficacia *in vivo* de la inmunización genética en monos, se generaron células dendríticas a partir de 40 ml de sangre periférica de macacos de cola de cerdo. Las células se transfectaron con el plásmido LW/int-, usando polietilenimina como se describió en el Ejemplo 5. Las DC transfectadas se lavaron y se inyectaron en macacos de cola de cerdo jóvenes 36-48 horas después de la transfección. Una parte de las DC transfectadas se inyectó subcutáneamente, y una parte se inyectó intravenosamente. Después de 4 semanas y sólo un intento de inmunización, un mono ya mostraba respuesta de CTL (Fig. 6), lo que sugiere que el resultado *in vitro* se puede reproducir *in vivo* en animales. Por el contrario, las vacunas de la subunidad de VIH aprobadas actualmente para los ensayos clínicos con humanos en fase III no han demostrado que generen respuesta de CTL alguna, incluso después de múltiples intentos de inmunización.

5. Transferencia génica mediada por polietilenimina en células dendríticas cultivadas

Se transdujeron células dendríticas con plásmido que codifica VIH-1/LWint- de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usó polietilenimina (PEI suministrada amablemente por el Dr. Behr) en lugar de lipofectamina. Las células se ensayaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, y más del 60% de las células dendríticas, transducidas usando polietilenimina, expresaron proteínas de VIH-1, en contraste con el 25-37% de células transducidas usando lipofectamina. Puesto que, hasta la fecha, la lipofección fue el mejor método de transferencia génica para introducir ADN plasmídico en DC, este experimento demuestra que PEI es el sistema de suministro génico no vírico más eficaz para transferir genes en DC. Sin embargo, tanto PEI como lipofectamina mostraron una toxicidad significativa para las células dendríticas, según se mide mediante tinción con azul de tripano.

6. Selección específica de DC como dianas vía el receptor de manosa

Se generaron DC inmaduras como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, y se transfectaron con ADN que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). Se usó este ADN como un marcador para la expresión génica, debido a que las células que expresan la proteína fluorescente verde se iluminan de color verde después de la estimulación fluorescente. Por lo tanto, las células transfectadas se pueden visualizar mediante microscopía fluorescente y citometría de flujo (FACS).

Se seleccionó PEI modificada con diferentes azúcares para seleccionar como diana el receptor de manosa sobre la superficie de células dendríticas, debido a que el receptor de manosa reconoce todos los patrones de azúcares sobre la superficie de bacterias, parásitos, levaduras y hongos. El ADN se complejó con PEI y con diferentes polietileniminas que contienen azúcar (disponibles según pedido normal al Dr. Jean-Paul Behr, Laboratoire de Chimie Genetique, Faculte de Pharmacie, CNRS-UMR 7514 74 route du Rhin 67401 Illkirch, Francia). Se incubaron 2 microgramos de ADN con diferentes derivados de PEI en 150 mM de NaCl (relación 10:1 de N:P), a temperatura ambiente durante alrededor de 5 minutos. Después, las DC se transdujeron con los complejos durante 6 horas, se lavaron, y las células fluorescentes verdes se analizaron después de 48 horas. Se encontró que la modificación de PEI-azúcar más eficaz es la PEI-manosa (Tabla 1).

TABLA 1

Diferentes complejos para la transducción in vitro de células dendríticas

Experimento	% de células que expresan la proteína fluorescente verde
1. Control	4
3. PEI-manosa-ADN	43
4. PEI-galactosa-ADN	23
5. PEI-glucosa-ADN	19

7. *Transferencia génica in vitro, mediada por PEI-manosa, en células dendríticas cultivadas*

La polietilenimina que tiene manosa (PEI-man) es un derivado de isotiocianantofenil fenilmanosa, acoplado a PEI de 25 kDa, que produce un ligando (o un resto de manosa de baja afinidad por el receptor de manosa, 1 mM). Se ha demostrado previamente que la entrada vía el receptor de asialoglicoproteína (usado por PEI) requiere que el complejo esté cargado. Esto es, se debe de usar más PEI que ADN. Cuando el complejo está neutro, esto es, el PEI está neutralizado por el ADN, el complejo no puede entrar vía el receptor de asialoglicoproteína. [Zanta MA; Boussif O; Adib A; Behr JP. *Bioconjug Chem* 1997 Nov-Dec; B(6):839-44]: estos investigadores desarrollaron un complejo dirigido a hepatocitos; incluye varias características claves que se piensa que favorecen el suministro génico *in vivo* al hígado: 1) partículas electrostáticamente neutras que evitan la unión no específica a otras células, y 2) para evitar la endocitosis mediada por el receptor de asialoglicoproteína. Este sistema se basó en un polímero de polietilenimina que contiene galactosa al 5% (PEI-gal), que está condensado con el ADN plasmídico hasta neutralidad.

Se encontró que, con los complejos de PEI-man-ADN, se requiere menos ADN para neutralizar PEI-man, en comparación con PEI. Los experimentos de electroforesis en gel usando una relación diferente de N:P de los complejos de PEI-ADN demostraron que 5:1 (N:P) de complejo de PEI-man:ADN tienen una carga neutra, en contraste con 3:1 (N:P) del complejo de PEI-ADN. {La neutralización de PEI con el ADN depende de la relación de N (nitrógeno):P (fosfato); un microgramo de ADN = 3×10^9 moles de P, y 1 mM de PEI = 109 molar de N/microlitro. Esto significa, por ejemplo, que la relación 10:1 es la mezcla de 3 microlitros de 10 mM de PEI y 1 microgramo de ADN}.

Se aislaron DC humanas como se describe anteriormente. La pureza de DC, caracterizada mediante FACS, fue de alrededor de 99%. Midiendo la viabilidad celular con tinción de azul de tripano, se encontró que PEI-man fue mucho menos tóxico que PEI. También se encontró que tanto PEI como PEI-man son capaces de introducir ADN en DC; sin embargo, PEI-manosa es más eficaz. A una relación de 5:1 (N:P), el complejo de PEI-man-ADN es neutro; por lo tanto, el complejo es capaz sólo de entrar en DC vía el receptor de manosa. En estas condiciones, el 30% de las DC expresaron la proteína verde fluorescente. Por el contrario, el complejo de PEI-ADN en la relación 5:1 (N:P) está cargado, y el complejo entra vía el receptor de asialoglicoproteína. En esta condición, el 14% de las DC expresaron la proteína verde fluorescente (Fig. 4).

8. *Suministro génico in vivo a células de Langerhans de la piel*

En la piel, las únicas células que pueden endocitar ligandos manosilados son las células de Langerhans. Por lo tanto, la cuestión principal fue si el complejo de PEI-(man) puede penetrar en la piel y transfectar células de Langerhans *in vivo*. Se complejó PEI-(man) con ADN plasmídico que codifica una proteína verde fluorescente (GFT). Se realizaron experimentos con diferentes complejos de suministro génico, como se describe en la Fig. 3. El complejo contenía 50 microgramos de ADN y 8,25 microlitros de 100 mM de PEI-man en una disolución de glucosa al 5-10% (óptimo = 8%). Se anestesiaron ratones BALB/c, y se afeitaron las espaldas de los ratones. Se aplicó 0,1 ml de los complejos sobre la piel durante una hora, o subcutáneamente, como se indica en la Tabla 2. Los ratones se sacrificaron 6 horas después de la inmunización, y las muestras de piel se colocaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de ternera y antibióticos. En estas condiciones, las células, incluyendo las células de Langerhans, migran hacia el exterior de la piel. Un día más tarde, las células migradoras se recogieron y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS), debido a que este análisis puede reconocer células que expresan la proteína fluorescente verde. En el análisis, sólo se analizó la población de células grandes y densas, debido a que se sabe que las células dendríticas y las células de Langerhans son células grandes y densas.

TABLA 2

Transducción in vivo de células de Langerhans de la piel

Experimento	% de células que expresan la proteína fluorescente verde
1. Control	0,84
2. PEI-ADN subcutáneo	0,20
3. ADN subcutáneo	1,74
4. PEI-ADN transcutáneo	6,52
5. ADN transcutáneo	29,10
6. PEI-man-ADN transcutáneo	22,99

Estos experimentos demuestran que 1) el suministro génico transcutáneo da como resultado una transferencia génica más eficaz de células de Langerhans que el suministro subcutáneo (compárense el experimento 2 y 4 ó 3 y 5). Esto es importante debido a que una de las mejores tecnologías de la clonación actuales usa la inyección subcutánea. 2) La entrada vía receptores de manosa es más eficaz para transfectar células de Langerhans *in vivo* que la entrada vía el receptor de asialoglicoproteína (compárense el experimento 4 y 6). Estos experimentos *in vivo* confirman el experimento *in vitro* (véase la Fig. 4). Por lo tanto, el sistema de suministro génico modificado con azúcar se prefiere para transducir células que presentan antígenos.

9. Las células de Langerhans transducidas migran hacia los ganglios linfáticos

Se prepararon ratones BALB/c como en el Ejemplo 8, y se aplicaron sobre la piel, durante una hora, muestras de 0,1 ml del complejo de PEI-man-ADN. Dos días más tarde los animales se sacrificaron, y se retiraron los ganglios linfáticos (LN). Los LN auxiliares se investigaron debido a que son los LN de drenaje de la espalda, y allí se pueden encontrar células de Langerhans que migran. Los LN se congelaron, se cortaron en trozos y se examinaron bajo el microscopio fluorescente. Los LN de ratones experimentales se compararon con los LN de un ratón de control. Fue posible detectar alrededor de 15 células fluorescentes verdes en las muestras procedentes de los LN experimentales, y ninguna en los LN del control. Estos resultados demuestran que el complejo entró en las células localizadas en la piel, las células fueron capaces de migrar hacia los LN, y expresar la proteína verde fluorescente. La morfología de estas células verdes se asemeja a la morfología de las DC: éstas son células grandes, y la localización de la fluorescencia verde muestra un patrón "lleno de baches", lo que es característico de las DC. (Otras células, por ejemplo las células 293, muestran un patrón verde difuso en el citoplasma). Además, el único tipo celular que es capaz de recoger antígenos y de migrar hacia los LN es la célula de Langerhans. Estas células son las únicas células en la piel que poseen el receptor de manosa a fin de captar el complejo, y, después de la activación, se sabe que migran a los LN de drenaje.

Estos experimentos muestran que los complejos de PEI-(man)-ADN son capaces de penetrar en la piel, y de suministrar el ADN a las células de Langerhans. Las células de Langerhans se activaron y migraron hacia los LN de drenaje, y expresaron genes codificados por el constructo de ADN en los LN. Se sabe que las DC cultivadas reinyectadas en el organismo migran hacia los LN, y generan una respuesta inmunitaria eficaz. La presente invención demuestra que el aislamiento *in vitro* de DC no es necesario para transferir genes a las células de Langerhans, o para la expresión génica en los órganos linfoides. También se ha demostrado que la expresión de un virus que presenta un defecto de replicación, en DC, da como resultado la inducción eficaz de una respuesta de CTL *in vitro* e *in vivo* (véase lo anterior). Por lo tanto, se ha demostrado que el suministro génico transcutáneo con complejos (como PEI-man-ADN) se puede utilizar para generar respuestas inmunitarias contra proteínas codificadas en el ADN.

10. Complejos de azúcar-ADN para transducir células de Langerhans de la piel

Los resultados experimentales representados en la Tabla 2 proporcionaron signos de que un complejo de azúcar-ADN, en presencia de PEI-man, puede transducir células de Langerhans *in vivo*. El ADN complejado con azúcar, en ausencia de PEI, es más eficaz para uso tanto en los métodos subcutáneos como transcutáneos que el ADN complejado con PEI (véase la Tabla 2, experimentos 3 y 5). Éste es un resultado muy sorprendente. Muestra que los azúcares (por ejemplo, glucosa al 8% en estos experimentos) también pueden complejar ADN y suministrar el ADN a las células de Langerhans vía el receptor de manosa. De forma importante, el suministro génico más eficaz *in vivo* para las células de Langerhans fue el azúcar complejado con ADN usado en la vía transcutánea.

Es de esperar que la inmunización con el complejo de azúcar-ADN también daría como resultado la migración de las células de Langerhans a los ganglios linfáticos de drenaje. La razón es que se utiliza el mismo mecanismo para la entrada a las células de Langerhans: la captación mediada por el receptor de manosa. La ventaja de usar azúcares como adyuvantes en las tecnologías de vacunación usadas actualmente es que se verían implicados porcentajes más

elevados de células de Langerhans en la generación de la respuesta inmunitaria. Es de esperar que esto aumente significativamente la eficacia de las actuales estrategias de vacunación. Por ejemplo, el mezclamiento de vacunas con azúcares para inyecciones subcutáneas, intradérmicas e intramusculares de ADN y de antígenos proteínicos.

5 11. *Implicaciones de la inmunización transcutánea*

Esta tecnología revolucionaría los métodos de inmunización debido a que no se requieren agujas. La inmunización transcutánea descrita es una tecnología muy simple que se podría usar para la vacunación barata tanto en el mundo desarrollado como en el subdesarrollado.

10

La simplicidad de la metodología y el hecho de que las células que presentan antígenos se transducen eficazmente permite usar cualquier secuencia de ADN capaz de generar una proteína inmunógena. De ese modo, el espectro más amplio de enfermedades puede convertirse en una diana de la inmunización, por ejemplo enfermedades infecciosas y cáncer.

15

El único modo para erradicar enfermedades infecciosas, como la infección por el VIH, la hepatitis, la malaria, es una simple vacunación barata.

20

Las vacunas sin agujas serían especialmente bienvenidas por los padres de niños pequeños.

El uso de la presente invención permite potencialmente el desarrollo de vacunas más seguras. Las pocas reacciones negativas a las vacunas clásicas son debidas algunas veces a una reacción alérgica a los subproductos del proceso de fabricación de la vacuna. Cuando se pueden eliminar tales materiales adicionales (por ejemplo, ovoalbúmina), se puede reducir concomitantemente la tasa de reacciones negativas.

25

Se puede usar para la inmunización para el tratamiento de enfermedades con o sin quimioterapia de combinación.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un complejo de suministro génico que comprende material genético extraño y un vector no vírico, en el que el vector tiene un primer sitio que tiene afinidad específica por el material genético extraño, y un segundo sitio que tiene afinidad específica por un receptor de una célula que presenta antígenos, para la preparación de un medicamento para uso en la inmunización preventiva o terapéutica transcutánea de animales exponiendo el animal al medicamento, exponiendo la piel o la superficie de la mucosa del animal al medicamento.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el material genético extraño se selecciona de entre el grupo constituido por ARN y ADN.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que el material genético extraño codifica un virus dependiente de la transcriptasa inversa o un virus mutante dependiente de la transcriptasa inversa.
- 15 4. Uso según la reivindicación 3, en el que el material genético extraño es ADN que codifica por lo menos una porción sustancial de un virus de inmunodeficiencia humana que presenta un defecto de replicación.
- 20 5. Uso según la reivindicación 3 ó 4, en el que el material genético extraño es ADN que codifica por lo menos una porción sustancial de un virus de inmunodeficiencia humana que presenta un defecto de integración.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que el material genético extraño es ADN que codifica por lo menos una porción sustancial de un mutante negativo a integrasa de un aislado primario con doble tropismo de un virus de inmunodeficiencia humana.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, en el que el ADN comprende además uno o más codones de parada en uno o más de los marcos de lectura del gen de integrasa.
8. Uso según la reivindicación 1, en el que el complejo se selecciona de entre el grupo constituido por conjugados de ADN con azúcares, polietilenimina, derivados de polietilenimina y sus mezclas.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, en el que el complejo es un conjugado de ADN con polietilenimina modificada con azúcar, especialmente polietilenimina modificada con manosa, galactosa o glucosa.
- 35 10. Uso según la reivindicación 8, en el que el complejo es un conjugado de ADN con glucosa.
11. Uso según la reivindicación 8, en el que el complejo tiene una afinidad específica por el receptor de manosa.
12. Uso según la reivindicación 1, en el que la célula que presenta antígenos es una célula de Langerhans.
- 40 13. Uso según la reivindicación 1, en el que la célula que presenta antígenos es una célula dendrítica.
14. Uso según la reivindicación 1, en el que el receptor es un receptor de manosa.
- 45 15. Uso según la reivindicación 1, en el que la inmunización es inmunización terapéutica de la infección de virus activa, y la inmunización comprende:
- tratar a un paciente que lo necesite con una combinación de fármacos adecuada para suprimir la carga vírica,
- 50 inmunizar al paciente con el producto, continuando el tratamiento con una combinación de fármacos adecuada para suprimir la carga vírica hasta que se desarrolla la respuesta inmunitaria,
- y monitorizar en busca del rebote de la carga vírica del paciente; y en el caso de que la carga vírica rebote, recomenzar el tratamiento con la combinación de fármacos, o con otra combinación de fármacos adecuada para suprimir la carga vírica, e inmunizar el paciente con el producto.
- 55 16. Uso según la reivindicación 15, en el que la infección vírica activa es una infección por VIH.
17. Complejo de suministro génico que comprende material genético extraño con un vector no vírico que es un derivado de polietilenimina-azúcar.
- 60 18. Complejo según la reivindicación 17, en el que el material genético extraño es ARN o ADN.
19. Complejo según la reivindicación 17, en el que el material genético extraño codifica un virus dependiente de la transcriptasa inversa o un virus mutante dependiente de la transcriptasa inversa.
- 65 20. Complejo según la reivindicación 19, en el que el material genético extraño es ADN que codifica por lo menos una porción sustancial de un virus de inmunodeficiencia humana que presenta un defecto de replicación.

ES 2 279 580 T3

21. Complejo según la reivindicación 19 ó 20, en el que el material genético extraño es ADN que codifica por lo menos una porción sustancial de un virus de inmunodeficiencia humana que presenta un defecto de integración.

5 22. Complejo según la reivindicación 21, en el que el material genético extraño es ADN que codifica por lo menos una porción sustancial de un mutante negativo a integrasa de un aislado primario con doble tropismo de un virus de inmunodeficiencia humana.

10 23. Complejo según la reivindicación 22, en el que el ADN incluye además uno o más codones de parada en uno o más de los marcos de lectura del gen de integrasa.

24. Complejo según la reivindicación 17, en el que el derivado se selecciona de polietilenimina modificada con manosa, galactosa o glucosa.

15 25. Composición que comprende un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

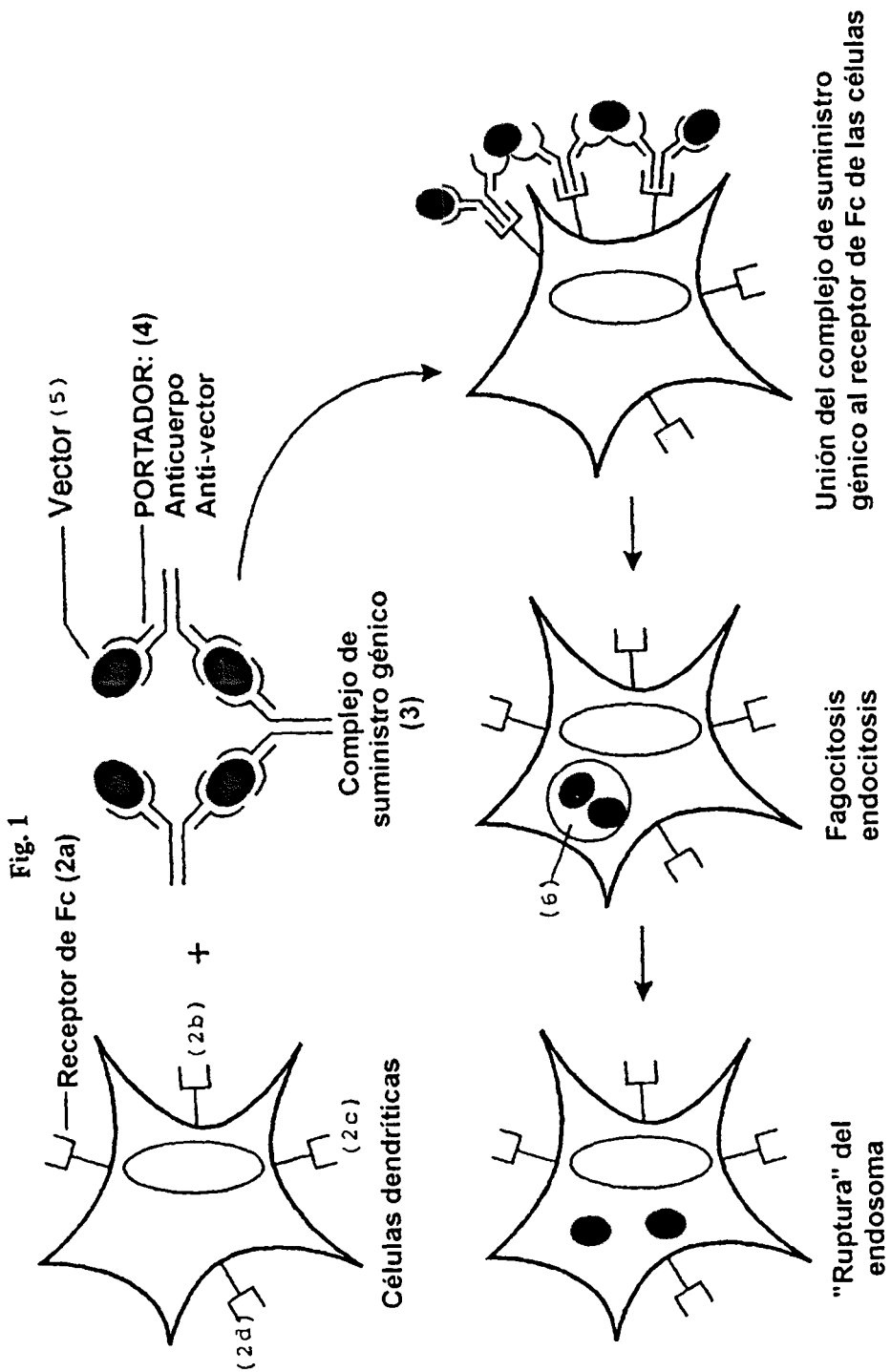
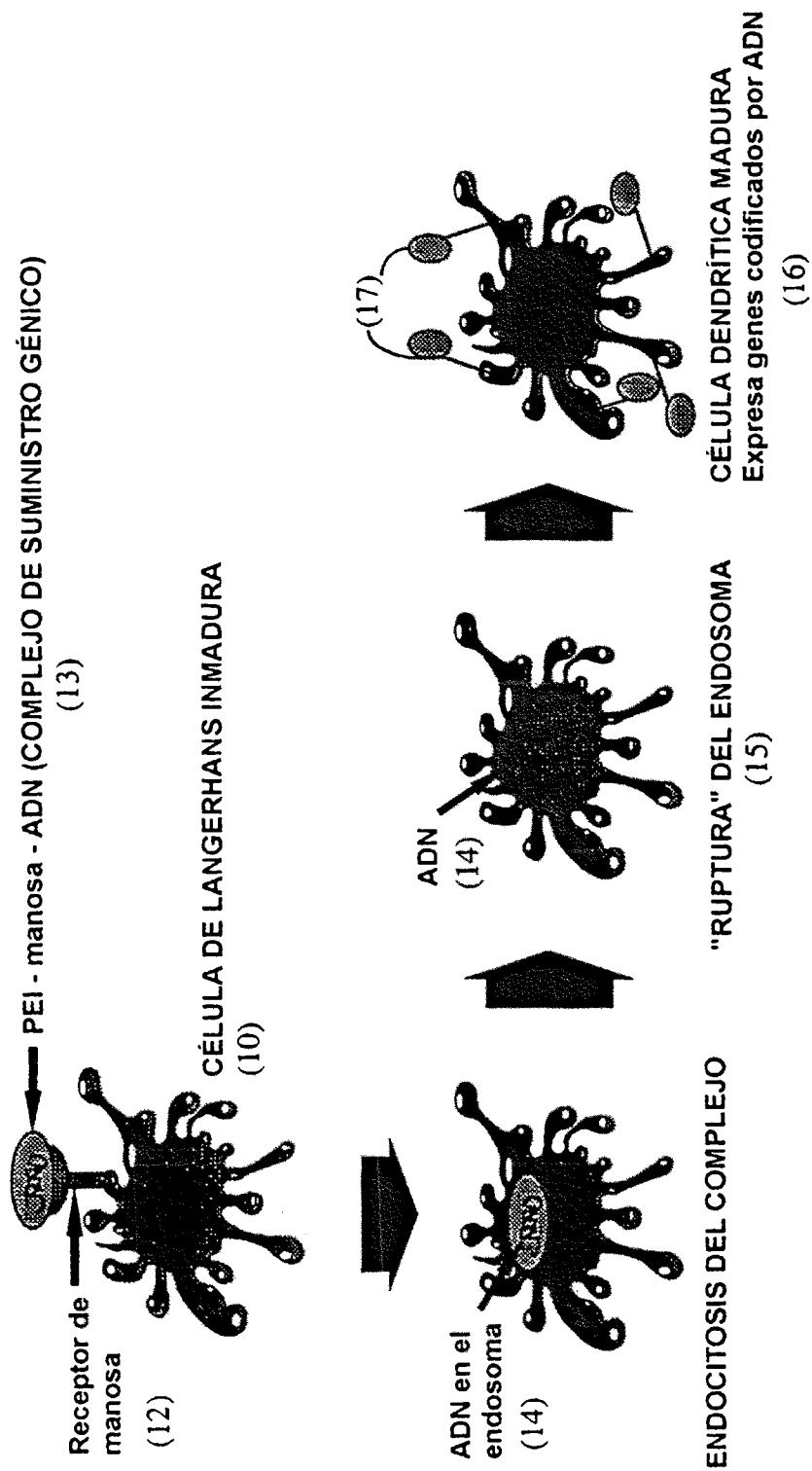


Fig. 2



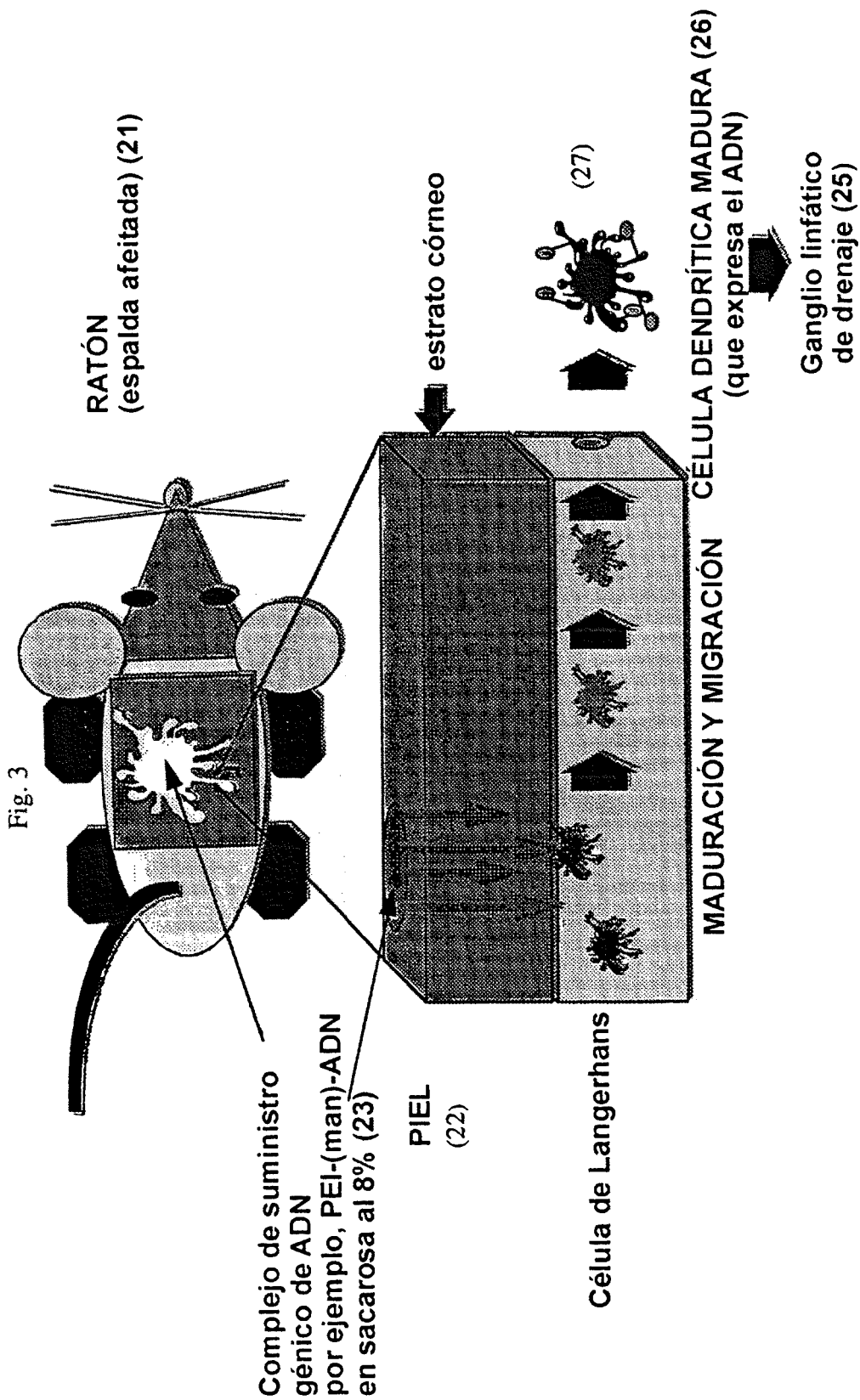


Fig. 4

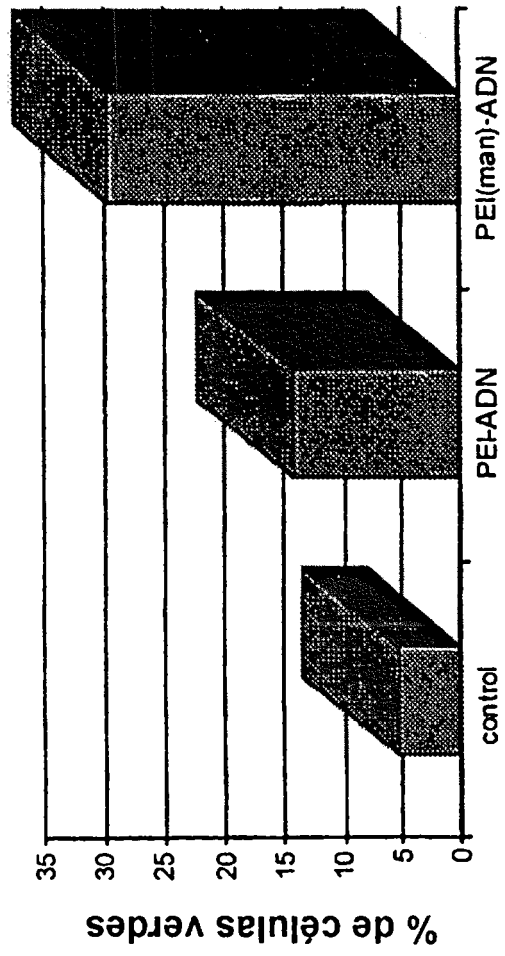


Fig. 5

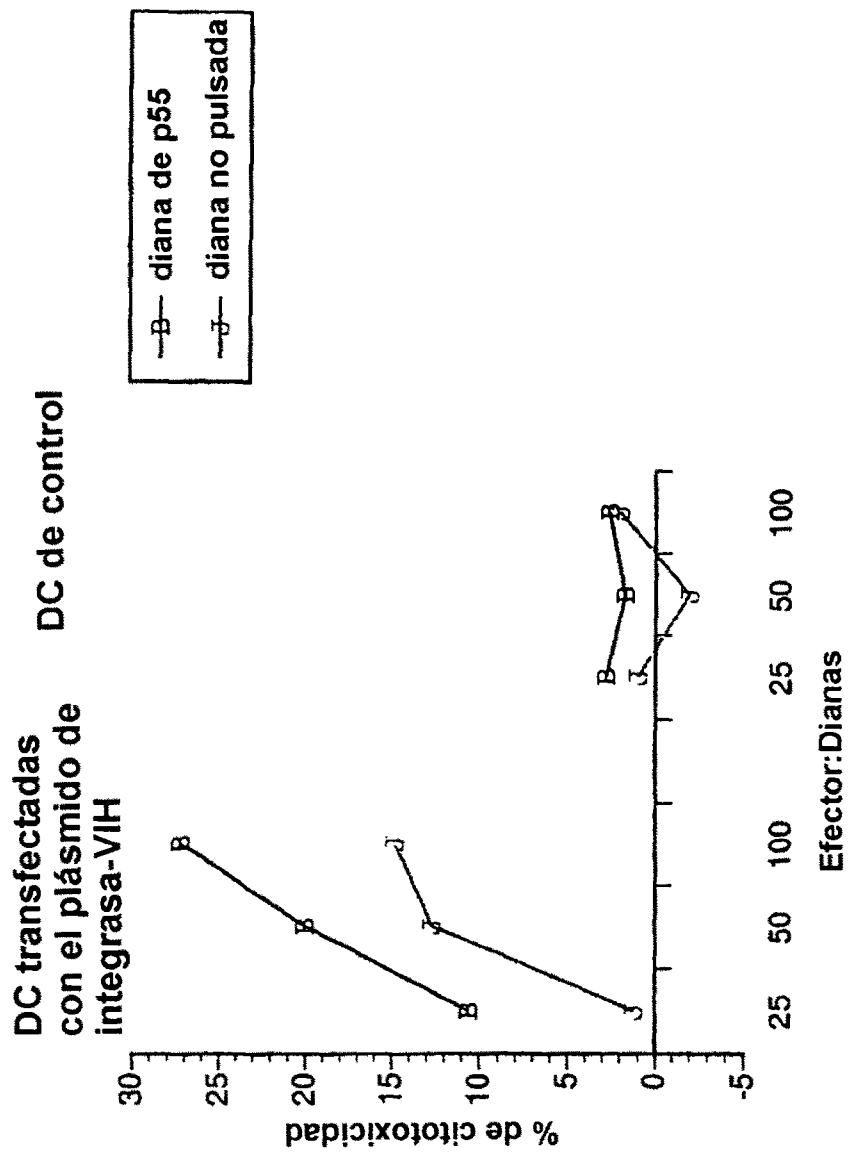


Fig. 6

