



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-129156

54. TÍTULO

"SECUENCIAS DE ACIDO NUCLEICO
COEFICIENTES Y COMPOSICIONES, QUE COMPRENDEN
PERIODOS DE SEÑAL Tg6 Y/O 31-15 Y METODOS
PARA EMPLEAR LOS MISMOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07H 21/04 A61K 48/00

71. SOLICITANTE

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA.

DOMICILIO

PHILADELPHIA, ESTADO DE PENNSYLVANIA, Estados
Unidos de América.

74. APODERADO

Alicia Uredea Escarotte
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D. C.,

22-Dic-2003.

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 03129156 00000000
 Fecha (MM): 2003-12-22 17:34:55
 Folios: 221
 Trámite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

13-01-06

① SOLICITUD DE:
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA Dirección: 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104-6283. Nacionalidad o Domicilio: Philadelphia, Estado de Pennsylvania, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Pennsylvania, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllico@lloredacarracho.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLORED A RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllico@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: WEINER, David, B.; KUTZLER, Michele; CHOO, Andrew, K.; YANG, Joo-Sung; y BOYER, Jean, D. Dirección: 717 Beacon Lane, Merion, PA 19066; 188 Penn Avenue, Souderton, PA 18964; 796 Dunleazy Place, Lansdale, PA 19446; Room 62207, Dept. Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, 300 Chuncheon-Dong, Jangsan-Ku, Suwon-City, Kyunggi-Do 440-746; 215 Woodlane Avenue, Haddonfield, NJ 08033. Nacionalidad o Domicilio: República de Korea y Estados Unidos de América.	

⑤ PCT (86)
 Solicitud Internacional No. PCT/US2004/018962 Fecha: 14/06/04
 Publicación Internacional No. WO 2005/000235 A3 Fecha: 06/01/05

⑥ Título (54) "SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANTES Y COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN PÉPTIDOS DE SEÑAL IgE Y/O IL-15 Y MÉTODOS PARA EMPLEAR LOS MISMOS"

⑦ Clasificación Internacional (51) C07H 21/04

⑧ Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US US	13/06/03 13/06/03	60/478,205 60/478,210

⑨ Comprobante de Pago No. 05 - 96.176 Fecha: 19-12-05

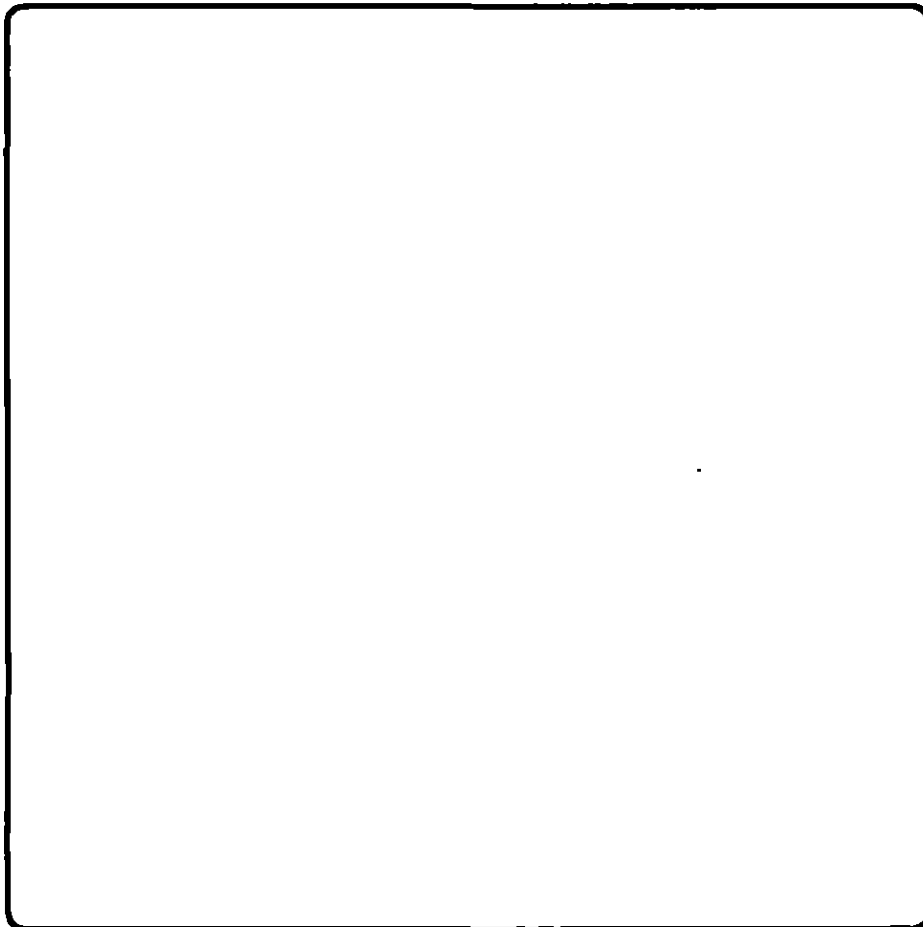
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Opinión Escrita con su traducción y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE:

ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05129156 00000000

Folios: 221

Fecha (MM): 2005-12-22 17:34:55

Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NUCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 96,176
FECHA : DICIEMBRE 19 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47045863	19/12/2005	8,351,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITE3 DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2005-07-14-401
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Teresa M Dunn,
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de Teresa M Dunn, Notario Público, Condado de Philadelphia, Commonwealth de Pennsylvania

Certificado

5. en Harrisburg, Pennsylvania
6. el día 5 de julio de 2005
7. por Pedro A. Cortés, Secretario del Commonwealth de Pennsylvania
8. No. 200522764
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
- Sello del Secretario del Commonwealth de Pennsylvania
- Pedro A. Cortés

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 8177/00 MINJUSFICIA
ANITA ESCOBAR DETAMAYO

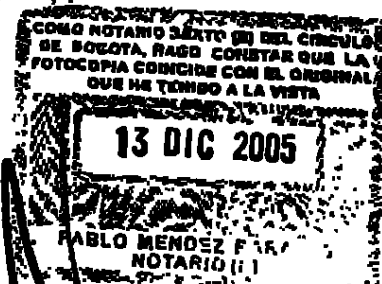
Certificado Notarial, documento escrito en inglés y en español.

(firma: ilegible)
6/29/05

Commonwealth of Pennsylvania

Hay un sello seco.

Sello Notarial
Teresa M Dunn, Notario Público
Ciudad de Philadelphia, Condado de Philadelphia
Mi Comisión Expira el 12 de agosto de 2007



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

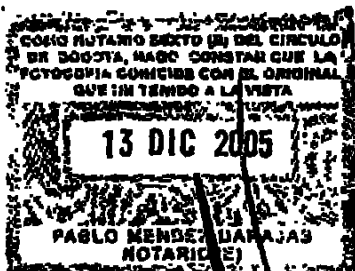
2005 JUL 15 A 9 49

LOS
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

firmado
133371

Legajo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



Legalización de un Poder, documento escrito en inglés y en español.

(firma: ilegible)

Timothy J. Raynor
Director, Propiedad Intelectual
Centro para Transferencia de Tecnología
Universidad de Pennsylvania

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 14 de julio de 2005,
en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial,
Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MIN JUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 DIC 2005
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

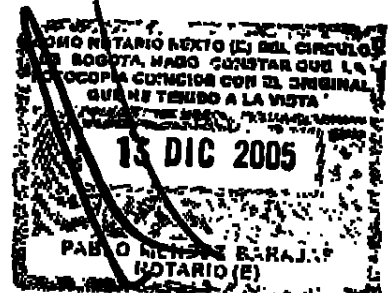
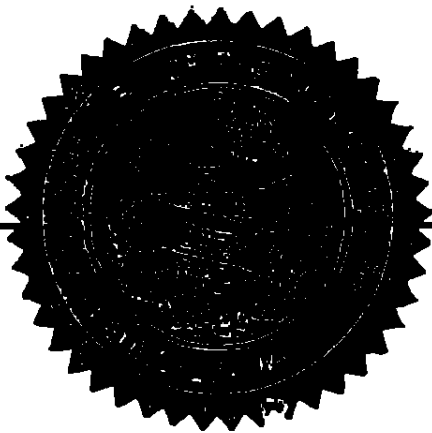
1. Country : United States Of America
2. This public document has been signed by TERESA M DUNN
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp TERESA M DUNN, NOTARY PUBLIC, PHILADELPHIA COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Certified

5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 5th day of July, 2005
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No : 200522764
9. Seal/Stamp
10. Signature

Pedro A. Cortés

Pedro A. Cortés



Y3042-Columbia

7

Los abajo firmados,

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, una sociedad organizada y existente bajo las leyes de

con domicilio en

3180 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104.8283 US

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned,

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, a corporation organized and existing under the laws of

domiciled at

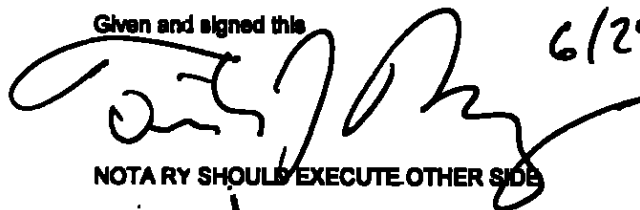
3180 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104.8283 US

herely appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogota, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourse and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

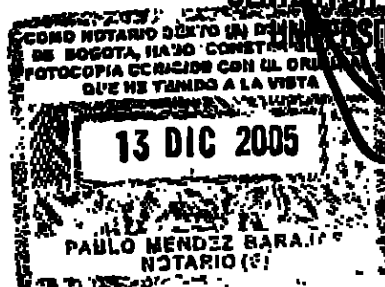
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

 6/29/05

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

TIMOTHY J. RAYNOR
DIRECTOR, INTELLECTUAL PROPERTY
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER
UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA



7

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de Pennsylvania
Condado de Philadelphia
Hoy 29 de Junio de 2005, compareció
Timothy J. Raynor, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
es Director, propiedad Intelectual

de THE TRUSTEES OF
THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA,
la compañía nombrada en el documento que
antecede, una sociedad debidamente organizada y
existente conforme a las leyes del Estado de
Estados Unidos de América, domiciliada en la
ciudad de
Philadelphia, Estado de Philadelphia, Estados
Unidos de América, legalmente constituida para un
período de duración que aún no ha terminado, que
ejerce su objeto social conforme a las leyes del
Estado de Pennsylvania

Estados Unidos de América;
que el declarante está autorizado por dicha
Compañía para conferir este poder, que el sello
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
Incorporación firmados en
Estado de , con fecha , y
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

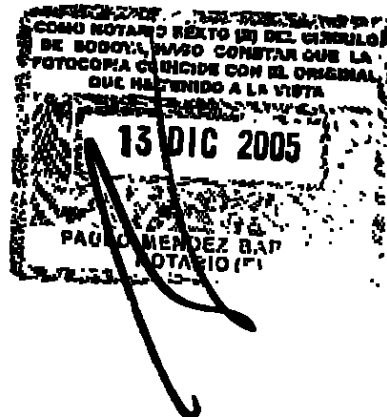
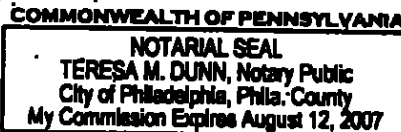
NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of Pennsylvania
County of Philadelphia
On this 29 day of June 2005,
personally
came Timothy J. Raynor
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the

of THE TRUSTEES OF
THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, the
company named within, a Corporation organized and
existing under the laws of the State of
United States of America, domiciled at the City of
Philadelphia, State of Philadelphia, United States of
America, legally constituted for a period of tenure not
yet expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of the State of
United States of America; that the deponent is
authorized by said Company to confer this power of
attorney; that the seal affixed hereunto by the
deponent in the name and on behalf of said
Corporation is the corporate seal thereof; and that
the purpose for which this instrument is granted is
included within the corporate purposes of the
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Phila., State of PA, under date of
, and hereby
certifies that under the laws of said State the
foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
facts therein contained are true, which he attests.

[Signature]
6/29/05



Extracto de Publicación
Folio 9

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES PCT REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente UPAP0020-500	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud Internacional No. PCT/US04/18962	Fecha de registro internacional (día/mes/año) Junio 14 de 2004 (14.06.2004)	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) Junio 13 de 2003 (13.06.2003)
Solicitante THE TRSUTBES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 4 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☐ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelada en la solicitud internacional, ver Casilla No. 1.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ Ninguna de las figuras se publicará con el resumen.

Forma PCT/ISA/210 (primera hoja) (Enero 2004)

Folios 10 y 11 faltantes

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/US04/18962

10

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
2. ☒ Reivindicaciones Nos.: 35 y 36
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
Las reivindicaciones 35 y 36 dependen de las reivindicaciones 58 ó 60 y las reivindicaciones 59, 62 o 64-67, respectivamente. Las reivindicaciones 58-60, 62 y 64-67 no fueron presentadas con esta solicitud.
3. ☒ Reivindicaciones Nos: 5, 6, 8, 12-24, 28, 34-36 y 41-46
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

73

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/US04/18962

A. CLASIFICACION DE MATERIA
 IPC(7) : C07H 21/04; A61K 48/00; C07K 14/00, 14/52
 US CL : 536/23.1, 23.4; 514/44; 530/350, 351
 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS
 Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)
 U.S.: 536/23.1, 23.4; 514/44; 530/350, 351
 Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados
 Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)
 por favor ver la continuación de la página

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X — Y	US 2002/0123099 A1 (WEINER et al.) 5 de Septiembre de 2002 (5.9 2002), ver el documento completo	38-40,48, 49-53 1-4, 25, 26, 27, 37, 47
Y	RUCKERT et al. IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a TH2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both. Eur. J. Immunol. Diciembre 1998, Vol. 28:3312-3320	1-4, 7, 25, 26, 27, 29, 37,47
Y	WIERDA et al. CD40-ligand (CD145) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. Blood. Noviembre 2000, Vol 96, páginas 2917-2924, ver el documento completo	7, 25
Y	ANETHER et al. Interleukin-15 as a potential costimulatory cytokine in CD154 gene therapy of chronic lymphocytic leukemia. Blood. Vol 99, páginas 722-723, ver el documento completo	7, 25

☐ En el recuadro C se enumeran más documentos.
 ☐ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:
 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular
 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional
 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)
 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios
 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada
 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención
 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo
 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica
 '&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 4 de Marzo de 2005 (04.03.2005)	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 7 de Abril de 2005
Nombre y dirección de correo de ISA/US Mail Stop PCT, Attn:ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsímile No. (703) 305-3230	Funcionario autorizado Ram Shukla

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US04/18962

12

Continuación de B. CAMPOS BUSCADOS Item 3:
STN: Medline
Términos Buscados il-15 fusion protein, IgE signal peptide, CD40L, CD154, leader sequence

7/5

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
MARK DELUCA
COZEN O'CONNOR
1900 MARKET STREET
PHILADELPHIA, PA 19103

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) **07 APR 2005**

Applicant's or agent's file reference
UPAP0020-500

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US04/18962

International filing date
(day/month/year) 14 June 2004 (14.06.2004)

Applicant
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90b(2.1) and 90b(2.3), respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Ram Shukla

Form PCT/IB/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference UPAP0020-300	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.
International application No. PCT/U804/18962	International filing date (day/month/year) 14 June 2004 (14.06.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13 June 2003 (13.06.2003)
Applicant THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Base of the Report**

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequences disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 35 and 36
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 35 and 36 depend on claims 58 or 60 and claims 59, 62 or 64-67, respectively. Claims 58-60, 62 and 64-67 were not filed with this application.
3. ☒ Claims Nos.: 5, 6, 8, 12-24, 28, 34-36 and 41-46
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/18962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : CO7H 21/04; A61K 48/00; CO7K 14/00, 14/92
US CL : S36/23.1, 23.4; 514/44; 530/350, 351

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 536/23.1, 23.4; 514/44; 530/350, 351

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0123099 A1 (WEINER et al.) 5 September 2002 (5.9.2002), see entire document	38-40, 48, 49-53
Y		1-4, 25, 26, 27, 37, 47
Y	RLICKERT et al. IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a TH2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both. Eur. J. Immunol. December 1998, Vol. 28: 3312-3320	1-4, 7, 25, 26, 27, 29, 37, 47
Y	WIERDA et al. CD40-ligand (CD145) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. Blood, November 2000, Vol 96, pages 2917-2924, see entire document	7, 25
Y	ANETHER et al. Interleukin-15 as a potential costimulatory cytokine in CD134 gene therapy of chronic lymphocytic leukemia. Blood. Vol 99, pages 722-723, see entire document	7, 25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier application or patent published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "E" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 March 2005 (04.03.2005)

Date of mailing of the international search report

07 APR 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Ram Shukla

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/18962

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

STN: Medline

Search Terms IL-15 fusion protein, IgE signal peptide, CD40L, CD134, leader sequence

28

DOCUMENTOS ANEXOS AL REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

1. US2002/0123099 A1
2. RUCKERT et al. IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both.
3. WIERDA et al. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia.
4. Interleukin-15 as a potential costimulatory cytokine in CD154 gene therapy of chronic lymphocytic leukemia.

Sep. 5, 2002

22

mRNA Energy Minimization in 1st 73 Bases

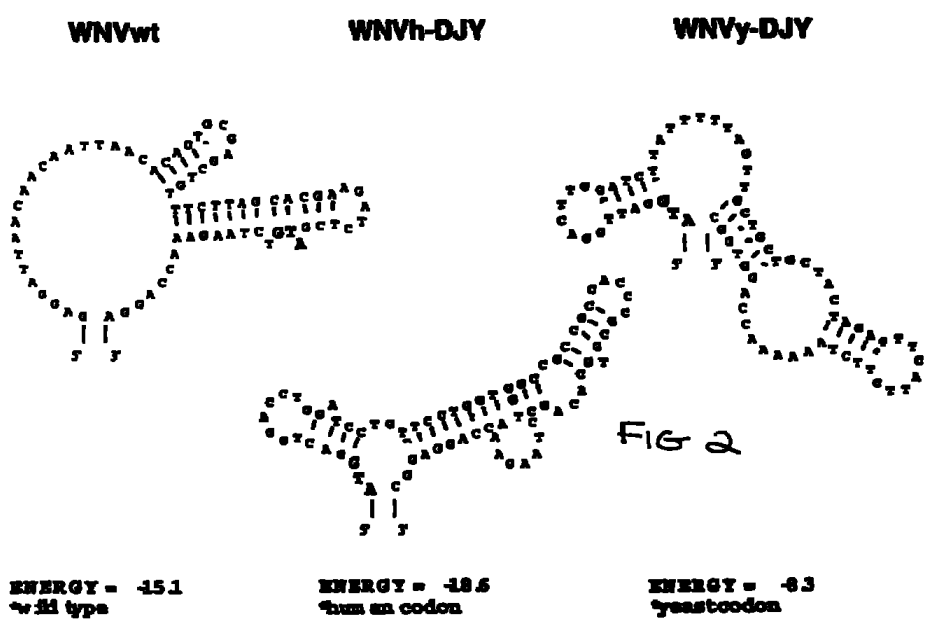


**Fig. 3 Immunoprecipitation of Radiolabeled
In Vitro Translated Proteins**

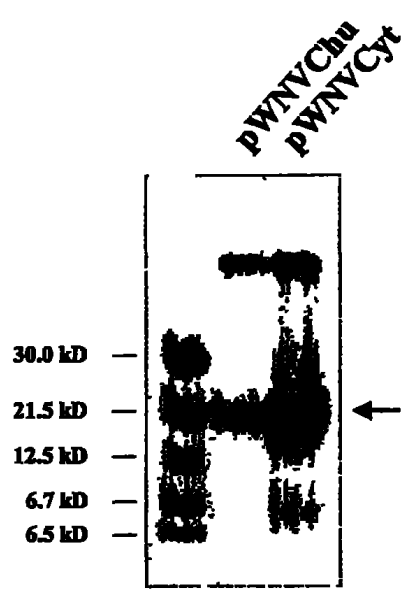
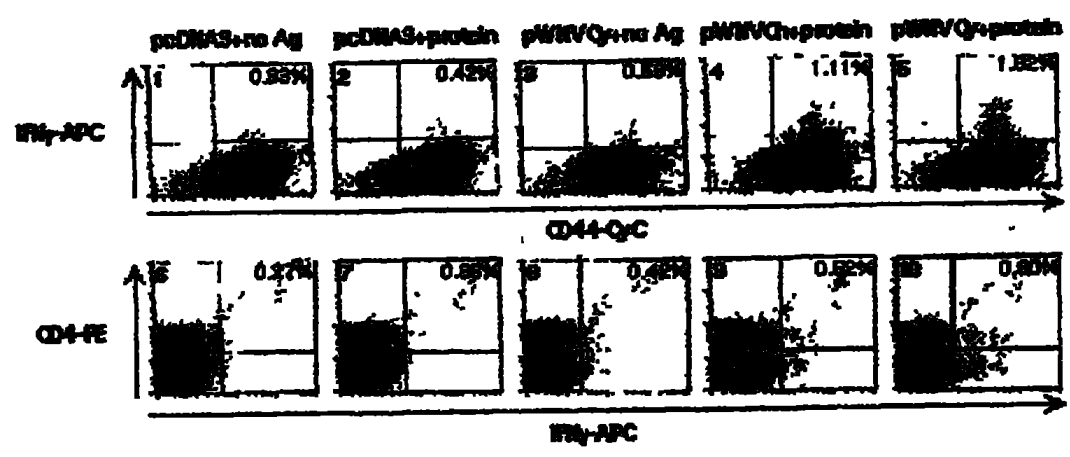
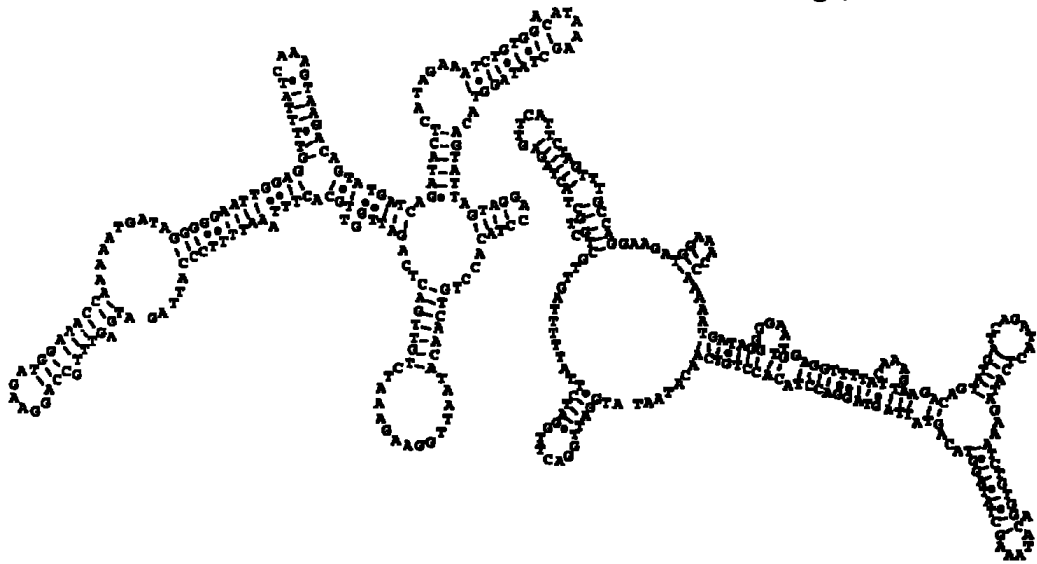


Fig. 4



mRNA Energy Minimization: Addition of Leader Sequence

Fig. 5

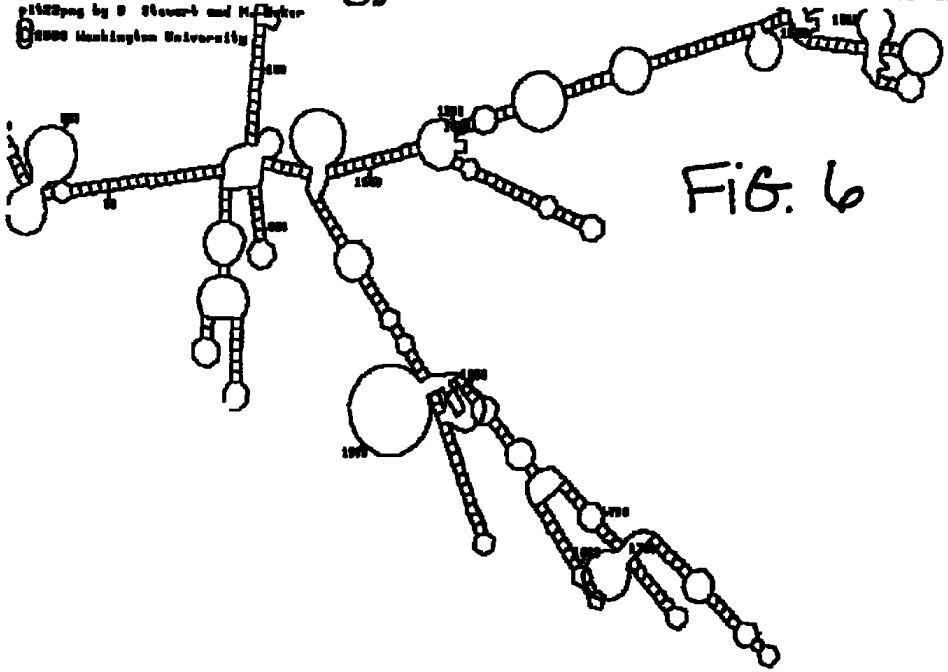


204 ENERGY = -26.8
poly t200m Length: 200

204 ENERGY = -25.4
shy+poly tLength: 200

mRNA Energy Minimization: HIV-1 Polwt

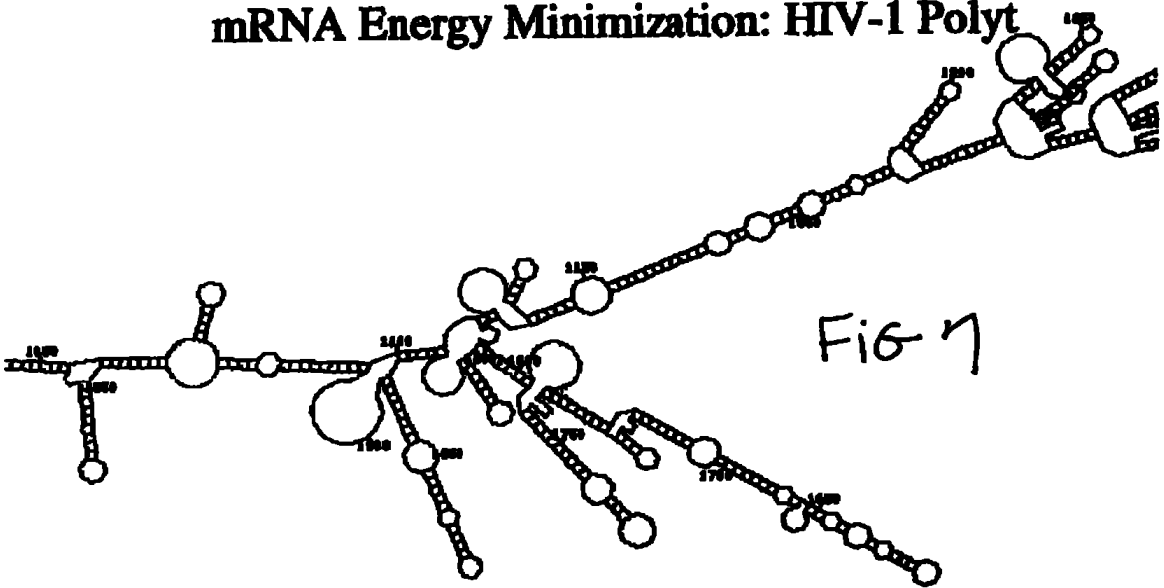
pl422pg by D. Stewart and H. Taylor
© 2000 Washington University



2/14/02 EACT-VIA-11-0001

25

mRNA Energy Minimization: HIV-1 Polyt

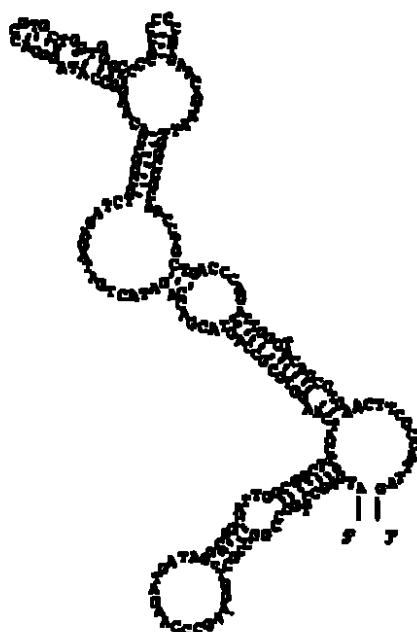


27

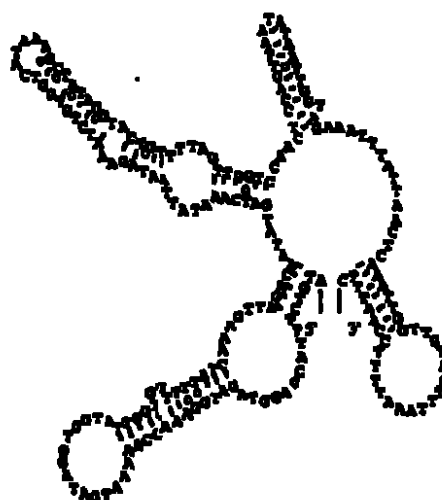
FIG 8 **mRNA Energy Minimization with 1st 200 bases**

HIV-1 Pol hu

HIV-1 Pol yt



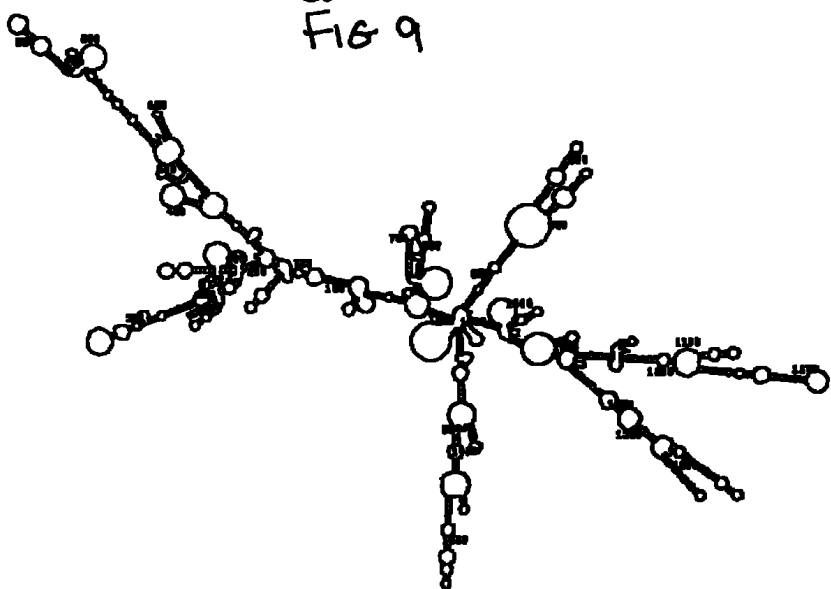
FREE ENERGY = -53.0 kcal
HIV-1 Pol hu Length: 200 bases



FREE ENERGY = -66.4 kcal
HIV-1 Pol yt Length: 200 bases

30

mRNA Energy Minimization: HIV-1 Gag-wt
Fig 9



$\Delta G = -351.07$ (initially -410.81) kcal/mol

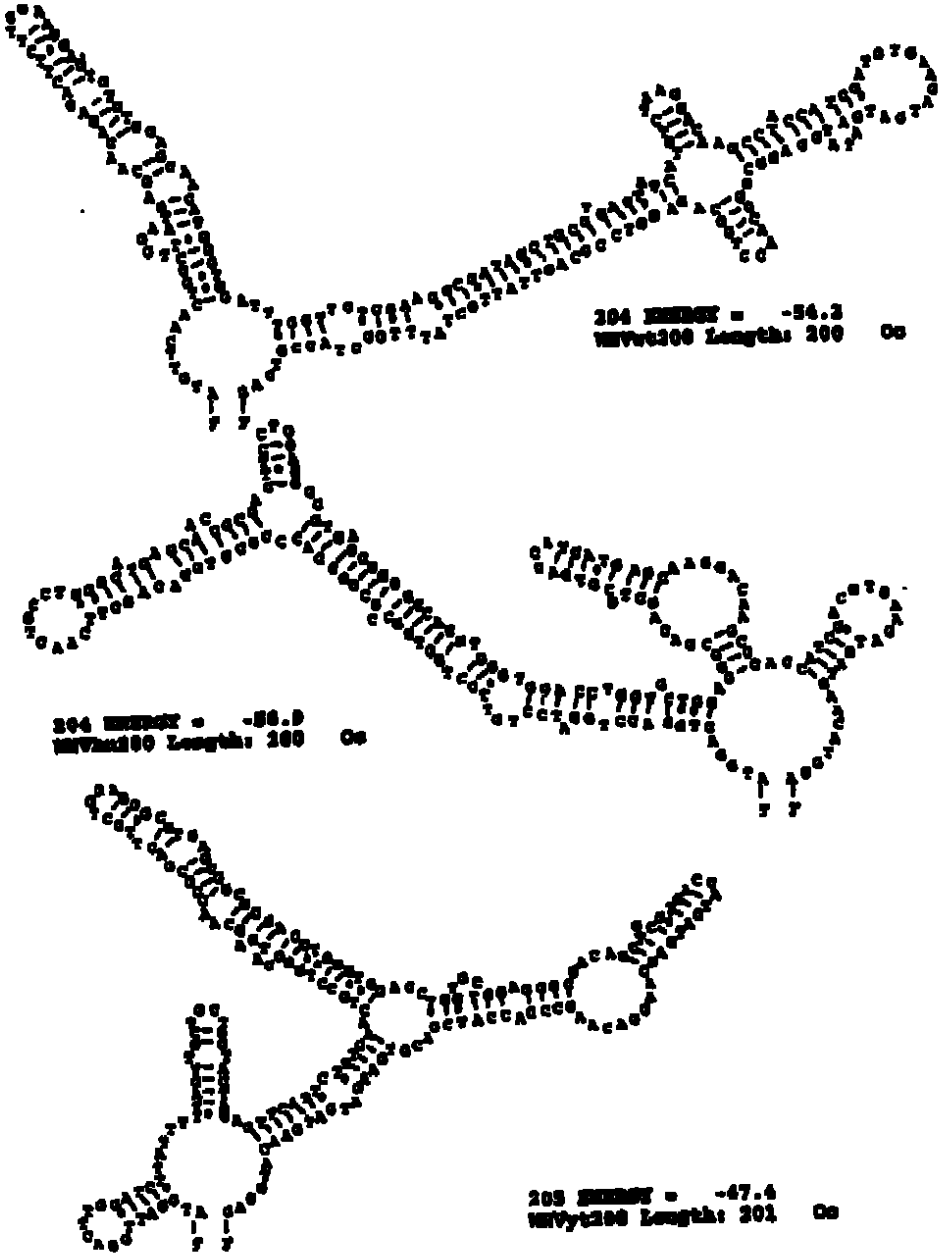
36

mRNA Energy Minimization: HIV-1 Gag-yt
FIG 10



30

FIG 11
WNV Env RNA Optimization



35

HIGHLY EXPRESSIBLE GENES**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application Ser. No. 60/237,885, filed Oct. 4, 2000, which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates generally to the fields of gene expression, gene therapy, and genetic immunization.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] The expression of a protein gene product is influenced by many factors, including gene copy number, gene integration site or gene location in the genome, transcription factors, mRNA stability, and translation efficiency. For example, the expression of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) structural genes *gag*, *pol*, and *env* is dependent on the *Rev/Rev-responsive element (RRE)* at a post-transcriptional level. This dependency on *Rev* is a limiting factor for gene expression. In addition, highly stable RNA secondary structures that form in various regions of the HIV RNA transcript can block or otherwise interfere with ribosome movement, and thus effectively limit translation. Formation of stable RNA secondary structures in gene transcripts is a general phenomenon that can limit the translational yield of many protein gene products for a wide variety of genes.

[0004] Kim et al., 1997, *Gene*, 199:293-301, which is incorporated herein by reference, optimized expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells by altering the codons encoding the leader sequence and the first 6 amino acids of the mature EPO protein for the most prevalently used yeast codons, and changing the codons encoding the rest of the EPO protein for the most prevalently used human codons.

[0005] U.S. Pat. Nos. US 5,972, 596 and 5,965,726 (Pavakis et al.), which are incorporated herein by reference, describe methods of beating an inhibitory/instability sequence or sequences (INS: sequences that render an mRNA unstable or poorly utilized/translated) within the coding region of an mRNA and modifying the gene encoding the mRNA to remove the inhibitory/instability sequences with clustered nucleotide substitutions.

[0006] There is a need for new methods of expressing proteins and methods of increasing the level of protein expression of therapeutic and immunogenic transgenes. There is a need for methods of increasing the translational yields of any protein gene product. There is a need for methods of overcoming the limitations imposed by RNA secondary structure in RNA transcripts upon the ultimate level of protein expression of any gene. The present invention is directed to addressing these and other needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] The present invention provides methods of producing protein in a recombinant expression system that comprises translation of mRNA transcribed from a heterologous DNA sequence in the expression system, said method comprising the steps of predicting the secondary structure of

mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence; modifying the native heterologous DNA sequence to produce a modified heterologous DNA sequence wherein mRNA transcribed from the modified heterologous DNA sequence has a secondary structure having increased free energy compared to that of the secondary structure of the mRNA transcribed from the native heterologous DNA sequence; and using the modified heterologous DNA sequence in the recombinant expression system for protein production. The recombinant expression system may be a cell free in vitro transcription and translation system, an in vitro cell expression system, a DNA construct used in direct DNA injection, or a recombinant vector for delivery of DNA to an individual. The secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence may be predicted using a computer and computer program. The native heterologous DNA sequence may be modified by increasing the AT content of the coding sequence, in particular, at the 5' end of the coding sequence, or at the 5' end of the coding sequence within 200, 150, or 100 nucleotides from the initiation codon.

[0008] The present invention also provides injectable pharmaceutical compositions comprising a nucleic acid molecule that includes a modified coding sequence encoding a protein operably linked to regulatory elements, wherein the modified coding sequence comprises a higher AT or AU content relative to the AT or AU content of the native coding sequence, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier. The encoded proteins may be immunogens or non-immunogenic therapeutic proteins. The modifications may be within the first 100 to 200 bases of the coding sequence, within stretches of sequences dispersed throughout the coding sequence, or within in the last 100 to 200 bases.

[0009] The present invention also provides recombinant viral vectors comprising a nucleic acid molecule that includes a modified coding sequence encoding a protein operably linked to regulatory elements, wherein the modified coding sequence comprises a higher AT or AU content relative to the AT or AU content of the native coding sequence.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0010] FIG. 1 presents the nucleotide and amino acid sequence of the West Nile Virus (WNV) wild type capsid (Cp) protein (WNVC) with constructs (WNVC_{hu} and WNVC_{cy}) modified on the basis of RNA secondary structure. A secretory IgE signal leader sequence was fused to the WNVC protein. To avoid varied expression levels due to the linear sequence between the promoter and 5'-proximal region of the WNVC, the leader sequences and the codons for amino acids 2-6 of the WNVC were modified with yeast (WNVC_{cy}) or human (WNVC_{hu}) optimized codons. However, the remaining portion of the coding sequence for the WNV capsid protein, in both constructs, was modified with human optimized codons. Presented are 1) the wild type nucleotide sequence encoding the *algE* leader sequence (4. *algE*orf) (SEQ ID NO: 1), 2) the amino acid sequence of the *algE* leader sequence (appearing above the nucleotide sequence) (SEQ ID NO:2), 3) the amino acid sequence for the WNV capsid protein (minus the initial methionine) (SEQ ID NO:3), and 4) the nucleotide sequence of the *algE*-WNV capsid protein encoding sequence of the WNVC_{hu}

construct (1. *algEh-WNVChu*) (SEQ ID NO:4). Differences in the coding sequence for *algEh-WNV* capsid protein in the *WNVCy* construct (2. *algEh-WNVCy**) and in the wild type *WNV* capsid encoding sequence (3. *WNVCwt*) are indicated below the nucleotide sequence of the *WNVCy* construct.

[0011] FIG. 2 presents the MulFold predicted RNA secondary structures with free energy values for the first 73 nucleotides of 1) the wild type mRNA encoding *WNV* capsid protein (*WNVCwt*), 2) an mRNA encoding the *algE* leader/*WNV* capsid protein containing human optimized codons (*WNVCy*), and 3) an mRNA encoding the *algE* leader/*WNV* capsid protein containing yeast optimized codons (*WNVCy**). The last codon (GGC for glycine) shown for the *WNVCy* sequence is human optimized. As shown, "T" represents "U" in the RNA strands. The nucleotides of the mRNA strands that encode the *algE* leader portion of the fusions in *WNVCy* and *WNVCy** are shown in bold.

[0012] FIG. 3 presents an autoradiograph of electrophoretically separated, immunoprecipitated, radiolabeled *in vitro* transcription/translation products from two different *WNV* capsid protein constructs: *pWNVCy* (also called *WNVCy*) and *pWNVCy** (also called *WNVCy**). The first lane on the left contains molecular weight markers. The arrow indicates the position of the main capsid protein product. The proteins, which are fusions with polyhistidine C-terminal tags, were immunoprecipitated using an anti-His antibody.

[0013] FIG. 4 presents the flow cytometry analysis of intracellular *INF-γ* expression in *in vitro* stimulated splenocytes from DNA immunized mice. Values presented are the percentage dual positive cells. In the upper panels, the cells were stained for *INF-γ* and CD44; in the lower panels the cells were stained for CD4 and *INF-γ*. The labeling across the top indicates the vector used to immunize the mice plus the stimulus used for the *in vitro* restimulation of the splenocytes. The immunizing vectors were *pcDNA3* (*pcDNA3.1*), *pWNVCy* (*pWNVCy*), and *pWNVCy** (*pWNVCy**). "No Ag" indicates that the splenocytes were incubated with an *in vitro* translation control (described in Example 2), "protein" indicates that the splenocytes were incubated with *in vitro* translated Cp protein product from the *pWNVCy* expression construct.

[0014] FIG. 5 presents the MulFold predicted RNA secondary structure with free energy values based upon energy minimization for the first 200 nucleotides of the wild type mRNA for the HIV-1 pol gene (*polwt200m*) and for the first 200 nucleotides of an mRNA for HIV-1 pol gene including a 5' sequence encoding the *lgE* leader sequence with codons less prevalently used in humans (yeast optimized) (*algE-polwt*). As shown, "T" represents "U" in the RNA strand.

[0015] FIG. 6 presents the MulFold predicted secondary structure of the mRNA for the HIV-1 pol structural gene.

[0016] FIG. 7 presents the MulFold predicted secondary structure for the mRNA for the HIV-1 pol structural gene after the 200 nucleotide region of the sequence from nucleotide 1738 through nucleotide 1938 has been altered to contain codons that are less prevalently utilized in humans (yeast optimized codons).

[0017] FIG. 8 presents the MulFold predicted secondary structure and overall free energy value for the first 200

nucleotides of the mRNA for the HIV-1 pol gene containing human optimized codons (HIV-1 Pol hu), and for the mRNA for the HIV-1 pol gene containing codons less prevalently utilized in humans (yeast optimized codons) (HIV-1 Pol yt). As shown, "T" represents "U" in the RNA strands.

[0018] FIG. 9 presents the MulFold predicted secondary structure and overall free energy value for the mRNA transcript for the HIV-1 gag structural gene.

[0019] FIG. 10 presents the MulFold predicted secondary structure and overall free energy value for the mRNA transcript for the HIV-1 gag structural gene altered with codons that are utilized less prevalently in humans (yeast optimized).

[0020] FIG. 11 presents the MulFold predicted secondary structures and overall free energy values for the first 200 nucleotides of the mRNA transcript for 1) the wild type West Nile Virus (*WNV*) envelope (*env*) gene (*WNVwt200*), 2) the *WNV env* gene optimized with the most prevalently used codons in humans (*WNVhu200*), and 3) the *WNV env* gene having codons that are utilized less prevalently in humans (yeast optimized, *WNVyt200*). As shown, "T" represents "U" in the RNA strands.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0021] The present invention is based upon the discovery that enhancement of protein expression can be achieved by increasing the free energy of and destabilizing RNA secondary structure through changes at the nucleotide level. It has been discovered that an increase in the free energy (kcal) of an RNA transcript will result in increased expression of the protein that it encodes. In preferred embodiments, an increase in the free energy (kcal) within a 200 base segment of an RNA transcript will result in increased expression of the protein that it encodes. The segment is preferably at the 5' end, usually including the initiation codon. In some embodiments, the segment is preferably 200 bases, 150 bases, or 100 bases. The secondary structure of an RNA molecule is the collection of base pairs that occur in its three-dimensional structure. The secondary structure of a given RNA molecule can be predicted and such predicted secondary structure will have an assigned overall free energy value. It has been discovered that alterations to the primary sequence of an RNA transcript that result in an increase to the minimum predicted

[0022] overall free energy for a predicted secondary structure for that RNA, or that increase the minimum predicted free energy for a predicted secondary structure for regions of that RNA, will promote increased expression of the protein encoded by that RNA transcript. This strategy for the optimization of protein expression applies to any situation where expression is desired, including, but not limited to: *in vivo*, including, but not limited to, DNA vaccines, live vaccines, gene therapeutics, and transgenes; *in vitro*, including, but not limited to, recombinant manufacturing procedures using such systems as prokaryotic and eukaryotic (mammal, insect, and yeast) cells in culture; *ex vivo*, including, but not limited to, systems where cells receive expression constructs and are implanted into recipient organisms; and any other expression system where it is desirable to express a gene of interest or increase the expression of a gene.

[0023] One aspect of the invention is to generate an RNA encoding a protein that promotes efficient expression of that protein or that leads to increased levels of expression of the protein. Alterations to the sequence of the DNA encoding the RNA that lead to an increase in the minimum overall free energy for the predicted secondary structure of that RNA, or that increase the minimum free energy for the predicted secondary structure of one or more regions of that RNA promote efficient and/or increased expression of the encoded protein.

[0024] Increases to the free energy of the secondary structure of an RNA can be monitored by analyzing various altered versions of a sequence with a program like MFOLD, which calculates and predicts the most stable structure for an input sequence based upon energy minimization. MFOLD is computer software designed by Zuker, Jaeger, and colleagues (see Zuker, 1989, On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule, *Science*, 244:48-52, and Jaeger et al., 1989, Improved predictions of secondary structures for RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7706-7710, each of which is incorporated herein by reference) that is used for the prediction of RNA secondary structure by free energy minimization, using energy rules developed by Turner and colleagues (see Freier et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9373-9377, which is incorporated herein by reference). Mfold is the Macintosh version of MFOLD. Loop-Dloop is a secondary structure drawing program. The most stable structure will be the one with a minimum overall free energy. The more negative the value of the free energy for the structure, the more stable. Alterations to the sequence of the RNA that are predicted to result in a secondary structure having an overall higher free energy value, are destabilizing alterations which result in less stable RNA secondary structure and which promote efficient translation of the RNA and an increase in protein expression.

[0025] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of virology, immunology, microbiology, molecular biology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2001); Glover & Hames, eds., *DNA Cloning 3: A Practical Approach*, Vols. I, II, & III, IRL Press, Oxford (1995); Colowick & Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press; Weir et al., eds., *Handbook of Experimental Immunology*, 5th ed., Blackwell Scientific Publications, Ltd., Edinburgh, (1997); Fields, Knipe, & Howley, eds., *Fields Virology* (3rd ed.) Vols. I & II, Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996); Flint, et al., eds., *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*, ASM Press, (1999); Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2001), each of which is incorporated herein by reference.

[0026] Various definitions are made throughout this document. Most words have the meaning that would be attributed to those words by one skilled in the art. Words specifically defined either below or elsewhere in this document have the meaning provided in the context of the present invention as a whole and as typically understood by those skilled in the art.

[0027] As used herein, the term "recombinant expression system" refers to any nucleic acid based approach or system for the expression of a gene product or gene products of interest, that has been artificially organized (man made) of components directed toward the expression of the gene product or products. The components may be of naturally occurring genetic sources, synthetic or artificial, or some combination of natural and artificial genetic elements. Generally the gene product is a protein, polypeptide, or peptide. Examples of recombinant expression systems include, but are not limited to, a cell free in vitro transcription and translation system; an in vitro cell expression system; a DNA construct used in direct DNA injection; and a recombinant vector for delivery of DNA to an individual.

[0028] As used herein, the term "heterologous DNA sequences" refers to deoxyribonucleic acid based sequences that are in a non-natural context, for example, in a recombinant construct, plasmid, or virus, or inserted into a non-natural position in a chromosome, or introduced into a non-natural or foreign cell. "Heterologous DNA sequence" refers to any DNA sequence that is foreign or not naturally associated with the other DNA sequences to which it is associated or linked (operably or otherwise), or a DNA sequence that is not naturally associated with the cell or organism into which it is introduced. An example of a heterologous DNA sequence is one that is used for the expression of a foreign or heterologous protein gene product in a host cell or organism. A heterologous DNA sequence can also be a part of a vector or expression construct having genetic material designed for directing the expression of a gene product, such as a protein, polypeptide, or peptide, in a host cell in vivo or in vitro, or in a cell free in vitro expression system.

[0029] As used herein, the term "native heterologous DNA sequence" refers to a heterologous DNA sequence that, although positioned in a non-natural context, has a nucleotide sequence that is not modified or altered from the sequence it has in its natural context. For example, a viral gene may be inserted into a recombinant expression construct, such that the viral gene is a heterologous DNA sequence with respect to other sequences in the construct, but without introduction of any changes to the nucleotide sequence of the viral gene. In this example, as a native heterologous DNA sequence, the viral gene has the native nucleotide sequence as would be found in its natural context within the genome of the virus, but the viral gene sequence is heterologous with respect to its new context. A native heterologous DNA sequence can also be any DNA sequence that is considered to be the reference or starting version of a DNA sequence, from which a modified (non-native) version of the DNA sequence, containing alterations to the nucleic acid sequence may be prepared. A native heterologous DNA sequence can also be composed of multiple native DNA sequences that are unaltered in sequence from that which is found in nature, but that are not naturally found together. An example of such a native heterologous DNA sequence composed of multiple native DNA sequences is a fusion gene composed of native genetic sequences from two different genes.

[0030] As used herein, the term "modified heterologous DNA sequence" refers to a heterologous DNA sequence that is not only positioned in a non-natural context, but also has a nucleotide sequence that is modified or altered from the

sequence it has in its natural context. For example, a viral gene that is a modified heterologous DNA sequence will be inserted into a recombinant expression construct, such that the viral gene is heterologous with respect to other sequences in the construct, and further, will have a nucleotide sequence that is modified or altered and not the native nucleotide sequence as found in its natural context within the genome of the virus.

[0031] As used herein, the term "increased free energy" in reference to RNA secondary structure, refers to an increase in the free energy value for an RNA secondary structure. Free energy values that are more negative are lower than values that are less negative.

[0032] As used herein, the term "modified coding sequence" refers to a nucleic acid sequence (DNA- or RNA-based), that encodes a gene product, protein, polypeptide, or peptide, and that has been modified or altered from the native or naturally-occurring coding sequence for that gene product, protein, polypeptide, or peptide. The coding sequence may be comprised of sequences from more than one genetic source, for example, the coding sequence may be a fusion gene encoding a fusion protein having a leader sequence from a gene for one protein and the remaining sequence from a gene for another protein, brought together as one hybrid coding sequence, that is non-natural. In the case of such an example of a coding sequence comprised of sequences from more than one genetic source, "modified coding sequence" indicates that any modification is relative to the native or naturally-occurring coding sequence for the respective separate sequences.

[0033] As used herein, the term "native coding sequence" refers to a nucleic acid sequence (DNA- or RNA-based), that encodes a gene product, protein, polypeptide, or peptide, and that has not been modified or altered from the native or naturally-occurring coding sequence for that gene product, protein, polypeptide, or peptide. If the coding sequence encodes a fusion protein, the component parts have not been modified or altered from the native or naturally-occurring coding sequence for those component parts.

[0034] As used herein, the term "higher AT or AU content" refers to modifications to a coding sequence which render it a "modified coding sequence" such that if it is DNA-based it has a higher concentration of adenine and thymidine residues than the corresponding native coding sequence, and if it is RNA-based it has a higher concentration of adenine and uridine residues than the corresponding native coding sequence.

[0035] As used herein, the term "the first 200 bases" in reference to a modified coding sequence that has been modified relative to the native coding sequence, refers to the first 200 contiguous nucleotide bases from the 5' end of the respective coding sequence.

[0036] As used herein, the term "the first 150 bases" in reference to a modified coding sequence that has been modified relative to the native coding sequence, refers to the first 150 contiguous nucleotide bases from the 5' end of the respective coding sequence.

[0037] As used herein, the term "the first 100 bases" in reference to a modified coding sequence that has been modified relative to the native coding sequence, refers to the first 100 contiguous nucleotide bases from the 5' end of the respective coding sequence.

[0038] As used herein, the term "the last 200 bases" in reference to a modified coding sequence that has been modified relative to the native coding sequence, refers to the last 200 contiguous nucleotide bases from the 3' end of the respective coding sequence.

[0039] As used herein, the term "the last 150 bases" in reference to a modified coding sequence that has been modified relative to the native coding sequence, refers to the last 150 contiguous nucleotide bases from the 3' end of the respective coding sequence.

[0040] As used herein, the term "the last 100 bases" in reference to a modified coding sequence that has been modified relative to the native coding sequence, refers to the last 100 contiguous nucleotide bases from the 3' end of the respective coding sequence.

[0041] As used herein, the term "region of up to 200 bases in length" in reference to a coding sequence, refers to a region of up to 200 contiguous nucleotide bases of the coding sequence. The region may be anywhere within the coding sequence.

[0042] As used herein, the term "region of up to 150 bases in length" in reference to a coding sequence, refers to a region of up to 150 contiguous nucleotide bases of the coding sequence. The region may be anywhere within the coding sequence.

[0043] As used herein, the term "region of up to 100 bases in length" in reference to a coding sequence, refers to a region of up to 100 contiguous nucleotide bases of the coding sequence. The region may be anywhere within the coding sequence.

[0044] As used herein, the term "dispersed modifications" refers to any combination of at least two regions of contiguous nucleotide bases that are modified to have a higher AT or AU content relative to the native coding sequence in the respective regions, and that are dispersed throughout the sequence such that regions of modified coding sequences will alternate with regions of native coding sequence. By way of non-limiting example, a modified coding sequence may contain alternating regions of modifications, wherein the first 200 contiguous bases of the coding sequence have a higher AT or AU content relative to the native coding sequence, the next 200 bases of the coding sequence are non-modified relative to the native coding sequence, and the subsequent 200 contiguous base region is modified to have a higher AT or AU content relative to the native coding sequence. The size of the modified regions may be of any length, and is preferably 200, 150, or 100 bases in length. The size of non-modified regions will be of variable length depending on the positioning of the modified regions. In preferred embodiments the dispersed modifications comprise alternating regions of modified and native coding sequence over the entire coding sequence, where the size of each alternating region is preferably 200 or 150 or 100 bases in length.

[0045] As used herein, "injectable pharmaceutical composition" refers to pharmaceutically acceptable compositions for use in patients that are sterile, pyrogen-free, and essentially free of any particulates or particulate matter. See, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990 and U.S.P., the standards of the U.S. Pharmacopela, which is incorporated herein by reference.

[0046] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any carrier that does not itself induce a harmful effect to the individual receiving the composition. For example, a "pharmaceutically acceptable carrier" should not induce the production of antibodies harmful to the recipient. Suitable "pharmaceutically acceptable carriers" are known to those of skill in the art and are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*.

[0047] As used herein the term "target protein" is meant to refer to peptides and proteins encoded by gene constructs of the present invention which act as target proteins for an immune response. The terms "target protein" and "immunogen" are used interchangeably and refer to a protein against which an immune response can be elicited. The target protein is an immunogenic protein which shares at least an epitope with a protein from the pathogen or undesirable cell-type such as a cancer cell or a cell involved in autoimmune disease against which an immune response is desired. The immune response directed against the target protein will protect the individual against and/or treat the individual for the specific infection or disease with which the target protein is associated.

[0048] As used herein the term "desired protein" is meant to refer to peptides and proteins encoded by gene constructs of the present invention which either act as target proteins for an immune response or as a therapeutic or compensating protein in gene therapy regimens.

[0049] As used herein, the phrase "immunogenic fragment thereof" in reference to an immunogen, refers to fragments of less than the full length of the immunogen against which an immune response can be induced.

[0050] As used herein, the term "cancer antigens" refers to any proteins, polypeptides, or peptides, and the like, that are associated with and/or serve as markers for cancer, tumors, or cancer cells.

[0051] As used herein, the term "autoimmune disease associated proteins" refers to any proteins, polypeptides, or peptides, and the like, that are associated with and/or serve as markers for cells involved in and/or responsible for an autoimmune disease.

[0052] As used herein, the term "non-immunogenic therapeutic protein" refers to such proteins, polypeptides, and peptides that are useful for therapeutic treatment of various diseases and disorders, and to which an immune response is not desired and/or not expected upon their introduction into the body of a recipient organism, patient, or individual in need of such therapy or treatment. Examples of "non-immunogenic therapeutic proteins" are proteins that are missing or in low concentration in an individual having a genetic defect in the endogenous gene encoding the protein. Examples of "non-immunogenic therapeutic proteins" include, but are not limited to, cytokines, growth factors, blood products, and enzymes.

[0053] As used herein, the term "recombinant viral vector" refers to a construct, based upon the genome of a virus, that can be used as a vehicle for the delivery of nucleic acids encoding proteins, polypeptides, or peptides of interest. Recombinant viral vectors are well known in the art and are widely reported. Recombinant viral vectors include, but are not limited to, retroviral vectors, adenovirus vectors, and

adeno-associated virus vectors, which are prepared using routine methods and starting materials.

[0054] As used herein, the term "genetic construct" refers to the DNA or RNA molecules that comprise a nucleotide sequence which encodes a target protein or immunomodulating protein. The coding sequence includes initiation and termination signals operably linked to regulatory elements including a promoter and polyadenylation signal capable of directing expression in the cells of the individual to whom the nucleic acid molecule is administered.

[0055] As used herein, the term "expressible form" refers to gene constructs which contain the necessary regulatory elements operably linked to a coding sequence that encodes a target protein or an immunomodulating protein, such that when present in the cell of the individual, the coding sequence will be expressed.

[0056] As used herein, the term "sharing an epitope" refers to proteins which comprise at least one epitope that is identical to or substantially similar to an epitope of another protein.

[0057] As used herein, the term "substantially similar epitope" is meant to refer to an epitope that has a structure which is not identical to an epitope of a protein but nonetheless invokes a cellular or humoral immune response which cross reacts to that protein.

[0058] As used herein, the term "intracellular pathogen" is meant to refer to a virus or pathogenic organism that, during at least part of its reproductive or life cycle, exists within a host cell and therein produces or causes to be produced, pathogen proteins.

[0059] As used herein, the term "hyperproliferative diseases" is meant to refer to those diseases and disorders characterized by hyperproliferation of cells.

[0060] As used herein, the term "hyperproliferative-associated protein" is meant to refer to proteins that are associated with a hyperproliferative disease and/or hyperproliferative cells.

[0061] In some preferred embodiments, it is preferred that the alterations to the RNA do not alter the sequence of the protein. In some preferred embodiments, it is preferred that the 200 bases, within which the alterations are introduced, are at the 5' end of the RNA transcript. In some embodiments, it is preferred to increase the free energy in more than one segment of the RNA transcript. Optionally, a leader sequence may be added to increase the free energy of the secondary structure of the RNA.

[0062] A stable RNA secondary structure at the 5' end of open reading frame (orf) sequences may block efficient transcription by interfering with ribosome function. Many RNAs have highly stable secondary structural integrity, and these interactions can inhibit gene expression. Addition of a sequence encoding a leader, modified such that it was optimized with an AT-rich sequence, resulted in a higher free energy for the predicted RNA structure and allowed efficient initiation by the cellular ribosomes. The stable RNA secondary structure is removed by increasing the free energy.

[0063] Therefore, according to the present invention, increasing the AU content in a coding sequence optimizes the sequence by reducing the corresponding RNA secondary

structure's integrity, and resulting in increased protein expression/translation, by melting of the inhibitory secondary structures (stem loops) in the RNA transcript. The disruption of secondary structure integrity is particularly important in the 5' portion of the RNA or coding sequence, particularly the first 100 to 200 nucleotides of the RNA. In some embodiments, the AU or AT content is increased in the first 100 to 200 nucleotides from the initiation of transcription, and in some embodiments the AU or AT content is increased in the first 100 to 200 nucleotides of the coding sequence or start of translation. In some embodiments, the disruption of secondary structure integrity of the RNA is achieved by full gene changes or alternating patterns within 100 to 200 nucleotide base stretches. Modification of the 3' end is also important.

[0064] The strategy of adding a leader-encoding sequence and altering the codons of that sequence to be yeast optimized (less frequently used codons in humans) is applicable to any gene encoding any protein, for example genes encoding viral proteins, including, but not limited to, the HIV-1 pol gene. AU-rich content is preferred; human dominant codons/high GC content is not preferred. It has been discovered that lowering the stability of regions of secondary structure within mRNAs can be accomplished without prior knowledge of protein expression or structure. The resultant increased minimum free energy of the secondary structure that is predicted to form from the altered transcript renders the altered transcript capable of enhanced protein expression over the original.

[0065] Using standard techniques and readily available starting materials, a modified nucleic acid molecule may be prepared. The nucleic acid molecule may be incorporated into an expression vector which is then incorporated into a host cell. Host cells for use in well known recombinant expression systems for production of proteins are well known and readily available. Examples of host cells include bacteria cells such as *E. coli*, yeast cells such as *S. cerevisiae*, insect cells such as *S. frugiperda*, non-human mammalian tissue culture cells Chinese hamster ovary (CHO) cells and human tissue culture cells such as HeLa cells.

[0066] In some embodiments, for example, one having ordinary skill in the art can, using well known techniques, insert DNA molecules into a commercially available expression vector for use in well known expression systems. For example, the commercially available plasmid pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) may be used for production of immunomodulating proteins in *E. coli*. The commercially available plasmid pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) may, for example, be used for production in *S. cerevisiae* strains of yeast. The commercially available MAXBACTM complete baculovirus expression system (Invitrogen, San Diego, Calif.) may, for example, be used for production in insect cells. The commercially available plasmid pcDNA1 or pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) may, for example, be used for production in mammalian cells such as CHO cells. One having ordinary skill in the art can use these commercial expression vectors and systems or others to produce immunomodulating proteins by routine techniques and readily available starting materials. (See e.g., Sambrook et al., eds., 2001, supra) Thus, the desired proteins can be prepared in both prokaryotic and eukaryotic systems, resulting in a spectrum of processed forms of the protein.

[0067] One having ordinary skill in the art may use other commercially available expression vectors and systems or produce vectors using well known methods and readily available starting materials. Expression systems containing the requisite control sequences, such as promoters and polyadenylation signals, and preferably enhancers, are readily available and known in the art for a variety of hosts (See e.g., Sambrook et al., eds., 2001, supra).

[0068] The expression vector including the modified DNA is used to transform the compatible host which is then cultured and maintained under conditions wherein expression of the foreign DNA takes place. The protein of the present invention thus produced is recovered from the culture, either by lysing the cells or from the culture medium as appropriate and known to those in the art. One having ordinary skill in the art can, using well known techniques, isolate the protein that is produced using such expression systems. The methods of purifying proteins from natural sources using antibodies may be equally applied to purifying protein produced by recombinant DNA methodology.

[0069] The pharmaceutical compositions of the present invention may be administered by any means that enables the active agent to reach the agent's site of action in the body of a mammal. The pharmaceutical compositions of the present invention may be administered in a number of ways depending upon whether local or systemic treatment is desired and upon the area to be treated. Administration may be topical (including ophthalmic, vaginal, rectal, intranasal, transdermal), oral or parenteral. Parenteral administration includes intravenous drip, subcutaneous, intraperitoneal or intramuscular injection, pulmonary administration, e.g., by inhalation or insufflation, or intrathecal or intraventricular administration.

[0070] The present invention further relates to injectable pharmaceutical compositions which comprise such nucleic acid molecules.

[0071] The injectable pharmaceutical compositions that comprise a modified nucleotide sequence operably linked to regulatory elements may be delivered using any of several well known technologies including DNA injection (also referred to as DNA vaccination), recombinant vectors such as recombinant adenovirus, recombinant adenovirus associated virus and recombinant vaccinia.

[0072] DNA vaccines are described in U.S. Pat. Nos. 5,593,972, 5,739,118, 5,817,637, 5,830,876, 5,962,428, 5,981,505, 5,580,859, 5,703,055, 5,676,594, and the priority applications cited therein, which are each incorporated herein by reference. In addition to the delivery protocols described in those applications, alternative methods of delivering DNA are described in U.S. Pat. Nos. 4,945,050 and 5,036,006, which are both incorporated herein by reference.

[0073] Routes of administration include, but are not limited to, intramuscular, intranasally, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous, intravenous, intraarterially, intraocularly and oral as well as topically, transdermally, by inhalation or suppository or to mucosal tissue such as by lavage to vaginal, rectal, urethral, buccal and sublingual tissue. Preferred routes of administration include to mucosal tissue, intramuscular, intraperitoneal, intradermal and subcutaneous injection. Genetic constructs may be administered by means including, but not limited to, traditional syringes, needleless injection devices, or "microprojectile bombardment gene guns".

[0074] When taken up by a cell, the genetic construct(s) may remain present in the cell as a functioning extrachromosomal molecule and/or integrate into the cell's chromosomal DNA. DNA may be introduced into cells where it remains as separate genetic material in the form of a plasmid or plasmids. Alternatively, linear DNA which can integrate into the chromosome may be introduced into the cell. When introducing DNA into the cell, reagents which promote DNA integration into chromosomes may be added. DNA sequences which are useful to promote integration may also be included in the DNA molecule. Alternatively, RNA may be administered to the cell. It is also contemplated to provide the genetic construct as a linear minichromosome including a centromere, telomeres and an origin of replication. Gene constructs may remain part of the genetic material in attenuated live microorganisms or recombinant microbial vectors which live in cells. Gene constructs may be part of gammexes of recombinant viral vaccines where the genetic material either integrates into the chromosome of the cell or remains extrachromosomal.

[0075] Genetic constructs include regulatory elements necessary for gene expression of a nucleic acid molecule. The elements include: a promoter, an initiation codon, a stop codon, and a polyadenylation signal. In addition, enhancers are often required for gene expression of the sequence that encodes the target protein. It is necessary that these elements be operable linked to the sequence that encodes the desired proteins and that the regulatory elements are operable in the individual to whom they are administered. Initiation codons and stop codon are generally considered to be part of a nucleotide sequence that encodes the desired protein. However, it is necessary that these elements are functional in the individual to whom the gene construct is administered. The initiation and termination codons must be in frame with the coding sequence. Promoters and polyadenylation signals used must be functional within the cells of the individual. Examples of promoters useful to practice the present invention, especially in the production of a genetic vaccine for humans, include but are not limited to promoters from Simian Virus 40 (SV40), Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) promoter, Human Immunodeficiency Virus (HIV) such as the HIV Long Terminal Repeat (LTR) promoter, Moloney virus, ALV, Cytomegalovirus (CMV) such as the CMV immediate early promoter, Epstein Barr Virus (EBV), Rous Sarcoma Virus (RSV) as well as promoters from human genes such as human Actin, human Myosin, human Hemoglobin, human muscle creatine and human metallothionein. Examples of polyadenylation signals useful to practice the present invention, especially in the production of a genetic vaccine for humans, include but are not limited to SV40 polyadenylation signals and LTR polyadenylation signals. In particular, the SV40 polyadenylation signal which is *hspCEP4* plasmid (Invitrogen, San Diego Calif.), referred to as the SV40 polyadenylation signal, is used. In addition to the regulatory elements required for DNA expression, other elements may also be included in the DNA molecule. Such additional elements include enhancers. The enhancer may be selected from the group including but not limited to: human Actin, human Myosin, human Hemoglobin, human muscle creatine and viral enhancers such as those from CMV, RSV and EBV. Genetic constructs can be provided with mammalian origin of replication in order to maintain the construct extrachromosomally and produce multiple copies of the construct in the cell. Plasmids *pCEP4*

and *pREP4* from Invitrogen (San Diego, Calif.) contain the Epstein Barr virus origin of replication and nuclear antigen EBNA-1 coding region which produces high copy episomal replication without integration.

[0076] One method of the present invention comprises the steps of administering nucleic acid molecules intramuscularly, intranasally, intraperitoneally, subcutaneously, intradermally, or topically or by lavage to mucosal tissue selected from the group consisting of inhalation, vaginal, rectal, urethral, buccal and sublingual.

[0077] In some embodiments, the nucleic acid molecule is delivered to the cells in conjunction with administration of a polynucleotide function enhancer or a genetic vaccine facilitator agent. Polynucleotide function enhancers are described in U.S. Ser. No. 08/008,342 filed Jan. 26, 1993, U.S. Ser. No. 08/029,336 filed Mar. 11, 1993, U.S. Ser. No. 08/125,012 filed Sep. 21, 1993, and International Application Serial Number PCT/US94/00899 filed Jan. 26, 1994, which are each incorporated herein by reference. Genetic vaccine facilitator (GVF) agents are described in U.S. Ser. No. 08/221,579 filed Apr. 1, 1994, which is incorporated herein by reference. The co-agents which are administered in conjunction with nucleic acid molecules may be administered as a mixture with the nucleic acid molecule or administered separately simultaneously, before or after administration of nucleic acid molecules. In addition, other agents which may function as transfecting agents and/or replicating agents and/or inflammatory agents and which may be co-administered with a GVF include growth factors, cytokines and lymphokines such as α -interferon, gamma-interferon, platelet derived growth factor (PDGF), TNF, epidermal growth factor (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-12 as well as fibroblast growth factor, surface active agents such as immune-stimulating complexes (ISCOMS), Freund's incomplete adjuvant, LPS analog including monophosphoryl Lipid A (MPL), muramyl peptides, quinone analogs and vesicles such as squalene and squalene, and hyaluronic acid may also be used administered in conjunction with the genetic construct. In some embodiments, an immunomodulating protein may be used as a GVF.

[0078] The pharmaceutical compositions according to the present invention comprise about 1 nanogram to about 2000 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, pharmaceutical compositions according to the present invention comprise about 5 nanogram to about 1000 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical compositions contain about 10 nanograms to about 800 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical compositions contain about 0.1 to about 500 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical compositions contain about 1 to about 350 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical compositions contain about 25 to about 250 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical compositions contain about 100 to about 200 micrograms DNA.

[0079] The pharmaceutical compositions according to the present invention are formulated according to the mode of administration to be used. In cases where pharmaceutical compositions are injectable pharmaceutical compositions, they are sterile, pyrogen free and particulate free. An isotonic formulation is preferably used. Generally, additives for

isotonicity can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol and lactose. In some cases, isotonic solutions such as phosphate buffered saline are preferred. Stabilizers include gelatin and albumin. In some embodiments, a vasoconstriction agent is added to the formulation.

[0080] The present invention is useful to elicit broad immune responses against a target protein, i.e., proteins specifically associated with pathogens, allergens or the individual's own "abnormal" cells. The present invention is useful to immunize individuals against pathogenic agents and organisms such that an immune response against a pathogen protein provides protective immunity against the pathogen. The present invention is useful to combat hyperproliferative diseases and disorders such as cancer by eliciting an immune response against a target protein that is specifically associated with the hyperproliferative cells. The present invention is useful to combat autoimmune diseases and disorders by eliciting an immune response against a target protein that is specifically associated with cells involved in the autoimmune condition.

[0081] The nucleic acid molecule(s) may be provided as plasmid DNA, the nucleic acid molecules of recombinant vectors or as part of the genetic material provided in an attenuated vaccine or cell vaccine. Alternatively, in some embodiments, the target protein and/or wither or both immunomodulating proteins may be delivered as a protein in addition to the nucleic acid molecules that encode them or instead of the nucleic acid molecules that encode them.

[0082] The present invention may be used to immunize an individual against all pathogens such as viruses, prokaryotic and pathogenic eukaryotic organisms such as unicellular pathogenic organisms and multicellular parasites. The present invention is particularly useful to immunize an individual against those pathogens which infect cells and which are not encapsulated such as viruses, and prokaryotes such as gonorrhea, listeria and shigella. In addition, the present invention is also useful to immunize an individual against protozoan pathogens which include a stage in the life cycle where they are intracellular pathogens.

[0083] In order to produce a genetic vaccine to protect against pathogen infection, genetic material which encodes immunogenic proteins against which a protective immune response can be mounted must be included in a genetic construct as the coding sequence for the target. Whether the pathogen infects intracellularly, for which the present invention is particularly useful, or extracellularly, it is unlikely that all pathogen antigens will elicit a protective response. Because DNA and RNA are both relatively small and can be produced relatively easily, the present invention provides the additional advantage of allowing for vaccination with multiple pathogen antigens. The genetic construct used in the genetic vaccine can include genetic material which encodes many pathogen antigens. For example, several viral genes may be included in a single construct thereby providing multiple targets.

[0084] Another aspect of the present invention provides a method of conferring a broad based protective immune response against hyperproliferating cells that are characteristic in hyperproliferative diseases and to a method of treating individuals suffering from hyperproliferative diseases. Examples of hyperproliferative diseases include all forms of cancer and psoriasis.

[0085] It has been discovered that introduction of a genetic construct that includes a nucleotide sequence which encodes an immunogenic "hyperproliferating cell"-associated protein into the cells of an individual results in the production of those proteins in the vaccinated cells of an individual. To immunize against hyperproliferative diseases, a genetic construct that includes a nucleotide sequence which encodes a protein that is associated with a hyperproliferative disease is administered to an individual.

[0086] In order for the hyperproliferative-associated protein to be an effective immunogenic target, it must be a protein that is produced exclusively or at higher levels in hyperproliferative cells as compared to normal cells. Target antigens include such proteins, fragments thereof and peptides which comprise at least an epitope found on such proteins. In some cases, a hyperproliferative-associated protein is the product of a mutation of a gene that encodes a protein. The mutated gene encodes a protein which is nearly identical to the normal protein except it has a slightly different amino acid sequence which results in a different epitope not found on the normal protein. Such target proteins include those which are proteins encoded by oncogenes such as myb, myc, fyn, and the translocation gene bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk and EGFR. In addition to oncogene products as target antigens, target proteins for anti-cancer treatments and protective regimens include variable regions of antibodies made by B cell lymphomas and variable regions of T cell receptors of T cell lymphomas which, in some embodiments, are also used target antigens for autoimmune disease. Other tumor-associated proteins can be used as target proteins such as proteins which are found at higher levels in tumor cells including the protein recognized by monoclonal antibody 17-1A and folate binding proteins.

[0087] While the present invention may be used to immunize an individual against one or more of several forms of cancer, the present invention is particularly useful to prophylactically immunize an individual who is predisposed to develop a particular cancer or who has had cancer and is therefore susceptible to a relapse. Developments in genetics and technology as well as epidemiology allow for the determination of probability and risk assessment for the development of cancer in individual. Using genetic screening and/or family health histories, it is possible to predict the probability a particular individual has for developing any one of several types of cancer.

[0088] Similarly, those individuals who have already developed cancer and who have been treated to remove the cancer or are otherwise in remission are particularly susceptible to relapse and recurrence. As part of a treatment regimen, such individuals can be immunized against the cancer that they have been diagnosed as having had in order to combat a recurrence. Thus, once it is known that an individual has had a type of cancer and is at risk of a relapse, they can be immunized in order to prepare their immune system to combat any future appearance of the cancer.

[0089] The present invention provides a method of treating individuals suffering from hyperproliferative diseases. In such methods, the introduction of genetic constructs serves as an immunotherapeutic, directing and promoting the immune system of the individual to combat hyperproliferative cells that produce the target protein.

[0090] The present invention provides a method of treating individuals suffering from autoimmune diseases and

disorders by conferring a broad based protective immune response against targets that are associated with autoimmunity including cell receptors and cells which produce "self"-directed antibodies.

[0091] T cell mediated autoimmune diseases include rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis (MS), Sjogren's syndrome, sarcoidosis, insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), autoimmune thyroiditis, reactive arthritis, ankylosing spondylitis, scleroderma, polyarthritis, dermatomyositis, psoriasis, vasculitis, Wegner's granulomatosis, Crohn's disease, and ulcerative colitis. Each of these diseases is characterized by T cell receptors that bind to endogenous antigens and initiate the inflammatory cascade associated with autoimmune diseases. Vaccination against the variable region of the T cells would elicit an immune response including CTLs to eliminate those T cells.

[0092] In RA, several specific variable regions of T cell receptors (TCRs) which are involved in the disease have been characterized. These TCRs include V β -3, V β -14, V β -17 and V α -17. Thus, vaccination with a DNA construct that encodes at least one of these proteins will elicit an immune response that will target T cells involved in RA. See: Howell et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10921-10925; Fallard et al., 1991, Science, 253:325-329; Williams et al., 1992, J. Clin. Invest., 90:326-333; each of which is incorporated herein by reference.

[0093] In MS, several specific variable regions of TCRs which are involved in the disease have been characterized. These TCRs include V β -7 and V α -10. Thus, vaccination with a DNA construct that encodes at least one of these proteins will elicit an immune response that will target T cells involved in MS. See: Wucherpfennig et al., 1990, Science, 248:1016-1019; Olsenberg et al., 1990, Nature, 345:344-346; each of which is incorporated herein by reference.

[0094] In scleroderma, several specific variable regions of TCRs which are involved in the disease have been characterized. These TCRs include V β -6, V β -8, V β -14 and V α -16, V α -3C, V α -7, V α -14, V α -15, V α -16, V α -28 and V α -12. Thus, vaccination with a DNA construct that encodes at least one of these proteins will elicit an immune response that will target T cells involved in scleroderma.

[0095] In order to treat patients suffering from a T cell mediated autoimmune disease, particularly those for which the variable region of the TCR has yet to be characterized, a synovial biopsy can be performed. Samples of the T cells present can be taken and the variable region of those TCRs identified using standard techniques. Genetic vaccines can be prepared using this information.

[0096] B cell mediated autoimmune diseases include systemic lupus erythematosus (SLE), Grave's disease, myasthenia gravis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenia, asthma, cryoglobulinemia, primary biliary sclerosis, and pernicious anemia. Each of these diseases is characterized by antibodies which bind to endogenous antigens and initiate the inflammatory cascade associated with autoimmune diseases. Vaccination against the variable region of antibodies would elicit an immune response including CTLs to eliminate those B cells that produce the antibody.

[0097] In order to treat patients suffering from a B cell mediated autoimmune disease, the variable region of the

antibodies involved in the autoimmune activity must be identified. A biopsy can be performed and samples of the antibodies present at a site of inflammation can be taken. The variable region of those antibodies can be identified using standard techniques. Genetic vaccines can be prepared using this information.

[0098] In the case of SLE, one antigen is believed to be DNA. Thus, in patients to be immunized against SLE, their sera can be screened for anti-DNA antibodies and a vaccine can be prepared which includes DNA constructs that encode the variable region of such anti-DNA antibodies found in the sera.

[0099] Common structural features among the variable regions of both TCRs and antibodies are well known. The DNA sequences encoding a particular TCR or antibody can generally be found following well known methods such as those described in Kabat et al., 1987, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda Md., which is incorporated herein by reference. In addition, a general method for cloning functional variable regions from antibodies can be found in Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1066, which is incorporated herein by reference.

[0100] In some of the embodiments of the invention that relate to gene therapy, the gene constructs contain either compensating genes or genes that encode therapeutic proteins. Examples of compensating genes include a gene which encodes dystrophin or a functional fragment, a gene to compensate for the defective gene in patients suffering from cystic fibrosis, an insulin, a gene to compensate for the defective gene in patients suffering from ADA, and a gene encoding Factor VIII. Examples of genes encoding therapeutic proteins include genes which encode erythropoietin, interferon, LDL receptor, GM-CSF, IL-2, IL-4 and TNF. Additionally, genetic constructs which encode single chain antibody components which specifically bind to toxic substances can be administered. In some preferred embodiments, the dystrophin gene is provided as part of a mini-gene and used to treat individuals suffering from muscular dystrophy. In some preferred embodiments, a mini-gene which contains coding sequence for a partial dystrophin protein is provided. Dystrophin abnormalities are responsible for both the milder Becker's Muscular Dystrophy (BMD) and the severe Duchenne's Muscular Dystrophy (DMD). In BMD dystrophin is made, but it is abnormal in either size and/or amount. The patient is mild to moderately weak. In DMD no protein is made and the patient is chairbound by age 13 and usually dies by age 20. In some patients, particularly those suffering from BMD, partial dystrophin protein produced by expression of a mini-gene delivered according to the present invention can provide improved muscle function.

[0101] In some preferred embodiments, genes encoding IL-2, IL-4, interferon, or TNF are delivered to tumor cells which are either present or removed and then reintroduced into an individual. In some embodiments, a gene encoding gamma interferon is administered to an individual suffering from multiple sclerosis.

[0102] In addition to using modified nucleic acid sequences to improve genetic vaccines, the present invention relates to improved attenuated live vaccines and improved vaccines which use recombinant vectors to deliver foreign genes that encode antigens. Examples of attenuated

live vaccines and those using recombinant vectors to deliver foreign antigens are described in U.S. Pat. Nos.: 4,722,848; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424; 5,225,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; and 5,482,713, which are each incorporated herein by reference. Gene constructs are provided which include the modified nucleotide sequence operably linked to regulatory sequences that can function in the vaccines to effect expression. The gene constructs are incorporated in the attenuated live vaccines and recombinant vaccines to produce improved vaccines according to the invention. Likewise modified nucleic acid sequences can be used in recombinant vectors useful to deliver gene therapeutics that encode desired proteins.

[0103] The present invention provides an improved method of immunizing individuals that comprises the step of delivering gene constructs to the cells of individuals as part of vaccine compositions which include are provided which include DNA vaccines, attenuated live vaccines and recombinant vaccines. The gene constructs comprise a nucleotide sequence that encodes an immunomodulating protein and that is operably linked to regulatory sequences that can function in the vaccines to effect expression. The improved vaccines result in an enhanced cellular immune response.

[0104] The invention is further illustrated by way of the following examples, which are intended to elaborate several embodiments of the invention. These examples are not intended, nor are they to be construed, as limiting the scope of the invention. It will be clear that the invention may be practiced otherwise than as particularly described herein. Numerous modifications and variations of the present invention are possible in view of the teachings herein and, therefore, are within the scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1

Materials and Methods

[0105] Prediction of mRNA secondary structure

[0106] To enhance translation efficiency of transgenes, RNA secondary structure was predicted by using Mfold and viewed by LoopDloop software for the Macintosh computer.

[0107] Immunoprecipitation of radiolabeled in vitro translated proteins

[0108] ³⁵S-labeled protein products were prepared using the TNT-T7 coupled Transcription/Translation System (Promega). 10 ml of radiolabeled protein sample and 1 ml of anti-His (C-term) antibody (Invitrogen, CA) were added to 300 μ l of RIPA buffer and mixed gently. After an incubation at 4° C. for 90 minutes, Protein A-Sepharose beads (AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) was added to the protein-antibody complexes at a final concentration of 5 mg per tube and the samples were then incubated at 4° C. for 90 minutes in a rotating shaker. The beads were washed three times with RIPA buffer and suspended in 2x SDS sample buffer. The immunoprecipitated protein complexes were eluted from the Sepharose beads by brief boiling and resolved in SDS/PAGE (15%) gels. The mobility of the

protein samples was compared with that of commercially available ¹⁴C-methylated molecular weight marker (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo.). The gel was fixed, treated briefly with 1M sodium salicylate solution and dried in a gel drier (BioRad, Hercules, Calif.). The dried gel was exposed overnight to X-ray film (Kodak, Rochester, N.Y.). The molecular size of the in vitro translated protein was 21.5 kD.

[0109] In vitro translated protein

[0110] Non-radioactive, in vitro translated Cp protein was also generated as described above, using the TNT-T7 coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, Wis.) with non-radioactive components. An in vitro translation control was generated using the in vitro translation kit with the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, San Diego, Calif.), lacking an expressible insert.

[0111] DNA inoculation of mice

[0112] The quadriceps muscles of 6- to 8-week-old female BALE/c mice (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Ind.) were injected with 100 μ g of pWNVh-DJY, pWNVy-DJY, or pcDNA3.1 in phosphate buffered saline (PBS) and 0.25% bupivacaine-HCl (Sigma, St. Louis, Mo.). Mice were injected with two DNA immunizations (100 μ g each) separated by two weeks. At thirteen days after the boost injection, the mice were sacrificed, the spleens were harvested, and the lymphocytes were isolated and tested for cellular immune responses.

[0113] Intracellular IFN- γ detection by flow cytometry

[0114] In each well of a round-bottom 96-well plate was placed 100 μ l of RPMI-1640 (supplemented with 5% FBS), containing 50 U/ml rHuIL-2 (InterGen, Purchase, N.Y.), 10 μ g/ml Brefeldin A (Pharmingen, San Diego, Calif.), 100 ng/ml PMA (Sigma, St. Louis, Mo.), and 1 μ g/ml ionomycin (Sigma, St. Louis, Mo.). Either in vitro translated protein or an in vitro translation control (generated using the in vitro translation kit with the vector backbone lacking an expressible insert), at 4 μ g/ml was added in 50 μ l of R5 medium. After adding the antigens (Ags), isolated splenocytes were added to each well at 1×10^6 cells in 50 μ l of R5 medium. For the compensation in flow cytometry, splenocytes from naïve mice were set up with only IL-2 and Brefeldin A. The plates were incubated in 37° C., 5% CO₂ in an incubator for 5 to 6 hours. As a control, cells were incubated without Ag. After incubation, the plate was spun at 1200 rpm for 5 minutes and the supernatants discarded. The cells were resuspended with 200 μ l of PBS, supplemented with 1% BSA, and put on ice for 15 minutes, and then spun down and resuspended with anti-CD4-FITC mAb (Pharmingen) at 0.1 μ g/sample in 50 μ l of PBS/1% BSA. After incubation for 30 minutes at 4° C., the cells were washed twice with PBS/1%. After the second wash, cell pellets were resuspended with 100 μ l of Cytofix/Cytoperm solution (Pharmingen) and incubated for 20 minutes at 4° C. The cells were washed twice with 1 x Perm/Wash (Pharmingen) and resuspended with 50 μ l of Penn/Wash solution containing anti-IFN- γ -APC 916 (Pharmingen) at 0.1 μ g/sample concentration. After incubation for 30 minutes at 4° C., the cells were washed twice with 1 x Perm/Wash solution and fixed with 2% paraformaldehyde, and then stored at 4° C. until analyzed by flow cytometry.

Example 2

Addition of Leader Sequence to West Nile Virus Capsid mRNA.

[0115] The addition of a leader sequence to minimize free energy in the West Nile Virus Capsid mRNA resulted in enhanced protein expression and immune response.

[0116] To enhance the transcription and translation efficiency of transgenes, the human IgE leader sequence was added to the 5' upstream of open reading frame (orf) sequences (FIG. 1).

[0117] The addition of a sequence encoding the human IgE leader sequence containing codons that are less prevalently utilized in humans (WNVy-DJY construct (yeast codon)) resulted in a predicted secondary structure for the mRNA having an increased free energy value, relative to the secondary structure for the mRNA without the leader sequence (WNVwt construct (wild type)), or relative to the secondary structure for the mRNA encoding a leader sequence optimized with human codons (WNVh-DJY construct (human codon)) (FIG. 2).

[0118] Furthermore, the construct encoding the leader sequence containing codons that are less prevalently utilized in humans (yeast optimized) yielded a higher level of protein than did the construct encoding the leader sequence containing human optimized codons, as determined by immunoprecipitation of radiolabeled in vitro translated proteins (FIG. 3; Table 1, yeast codon usage). The codons more prevalently used by yeast are, in general, AU rich; the codons more prevalently used by *Homo sapiens* are, in general, more GC rich (see Kim et al., 1997, Gene, supra).

TABLE 1		
Yeast codon utilization		
Amino Acid		Yeast codon
A	Ala	OCU
R	Arg	AOA
N	Asn	AAU
D	Asp	GAU
C	Cys	UOU
Q	Gln	CAA
E	Glu	GAA
G	Gly	GGU
H	His	CAU
I	Ile	AUU
L	Leu	UUA
K	Lys	AAA
P	Phe	CCA
F	Phe	UUU
S	Ser	UCU
T	Thr	ACU
W	Trp	UGG
Y	Tyr	UAU
V	Val	GUU

[0119] DNA plasmid injection into mouse muscle induced an antigen-specific, CD4⁺ Th cell-dependent immune response, as determined by intracellular IFN- γ /flow cytometry analysis. The CD4⁺ Th cell-dependent, intracellular IFN- γ production was quantitated by flow cytometry. Splenocytes isolated from pWNVy-DJY (pWNVcy)-immunized mice, expressed higher levels IFN- γ , upon stimulation with in vitro translated Cp protein, than did the splenocytes isolated from pWNVh-DJY (pWNVch)-immunized mice (see FIG. 4)

Example 3

Removal of RNA Secondary Structure in HIV-1 pol RNA by Increasing the Minimum Predicted Free Energy.

[0120] The strategy of adding a leader encoding sequence and altering the codons to be yeast optimized (less frequently used in human) was applied to the HIV-1 pol gene. When nucleic acid sequence encoding the IgE leader sequence with codons less prevalently used in humans (yeast optimized) was added to the 5' end of HIV-1 pol gene, the predicted free energy of the energy minimized transcript was increased (FIG. 5).

[0121] In HIV-1 pol structural gene, several regions of stable secondary structure, located between nucleotide (nt) 1738 and nt 1938, were predicted by Mfold analysis (FIG. 6). Alteration of the codons in the region from nt 1738 to nt 1938 to codons less prevalently utilized in humans (yeast optimized codons) resulted in a weakening of the secondary structure in that region. The predicted secondary structure for the region with the modified codons had a higher free energy than the predicted secondary structure for the original sequence (FIG. 7). In addition, the formation of mRNA secondary structure in the first 200 nucleotides of the pol gene was minimized by using codons less prevalently utilized in humans (yeast optimized codons) (HIV-1 Pol yt), as compared to a transcript containing the most prevalently utilized codons in humans (human optimized codons) (HIV-1 Pol hu) (FIG. 8). The minimum free energy was dramatically increased from -53.0 kcal to -26.4 kcal.

Example 4

Removal of RNA Secondary Structure in HIV-1 gag RNA by Increasing the Minimum Predicted Free Energy.

[0122] Several regions of regions of stable secondary structure were predicted by Mfold analysis for the transcript for the HIV-1 gag structural gene (FIG. 9), and the minimum free energy was increased (from -351.07 kcal to -283.11 kcal) by using codons that are utilized less prevalently in humans (yeast optimized) (FIG. 10).

Example 5

Removal of RNA Secondary Structure in WNV env RNA by Increasing the Minimum Predicted Free Energy.

[0123] In the West Nile Virus envelope (env) gene, application of the strategy of mRNA energy minimization in the first 200 base pairs (bp) of the gene with codons that are utilized less prevalently in humans (yeast optimized, WNVyt200) increased the minimum free energy of the cognate transcript as compared to the transcript for the wild type WNV env gene (WNVwt200) or as compared to a transcript optimized with the most prevalently used codons in humans (WNVhu200) (FIG. 11).

[0124] The foregoing examples are meant to illustrate the invention and are not to be construed to limit the invention in any way. Those skilled in the art will recognize modifications that are within the spirit and scope of the invention.

[0125] All references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

What is claimed is:

1. A method of producing a protein in a recombinant expression system that comprises translation of mRNA transcribed from a heterologous DNA sequence in the expression system, said method comprising the steps of:

- a) predicting the secondary structure of mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence;
- b) modifying the native heterologous DNA sequence to produce a modified heterologous DNA sequence wherein mRNA transcribed from the modified heterologous DNA sequence has a secondary structure having increased free energy compared to that of the secondary structure of the mRNA transcribed from the native heterologous DNA sequence; and

- c) using the modified heterologous DNA sequence in the recombinant expression system for protein production.

2. The method of claim 1, wherein the recombinant expression system is selected from the group consisting of: a cell free *in vitro* transcription and translation system; an *in vitro* cell expression system; a DNA construct used in direct DNA injection; and a recombinant vector for delivery of DNA to an individual.

3. The method of claim 1, wherein the secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence is predicted using a computer and computer program.

4. The method of claim 1, wherein the secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence is modified by increasing the AT content of the coding sequence.

5. The method of claim 4, wherein the secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence is modified by increasing the AT content of the coding sequence at the 5' end of the coding sequence such that mRNA transcribed therefrom has an increased AU content.

6. The method of claim 5, wherein the secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence is modified by increasing the AT content of the coding sequence at the 5' end of the coding sequence within 200 nucleotides from the initiation codon such that mRNA transcribed therefrom has an increased AU content.

7. The method of claim 6 wherein the secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence is modified by increasing the AT content of the coding sequence at the 5' end of the coding sequence within 150 nucleotides from the initiation codon such that mRNA transcribed therefrom has an increased AU content.

8. The method of claim 6 wherein the secondary structure of the mRNA transcribed from a native heterologous DNA sequence is modified by increasing the AT content of the coding sequence at the 5' end of the coding sequence within 100 nucleotides from the initiation codon such that mRNA transcribed therefrom has an increased AU content.

9. An injectable pharmaceutical composition comprising a nucleic acid molecule that includes a modified coding sequence encoding a protein operably linked to regulatory elements, wherein the modified coding sequence comprises a higher AT or AU content relative to the AT or AU content

of the native coding sequence, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

10. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the first 200 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

11. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the first 150 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

12. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the first 100 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

13. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in at least one region of up to 200 bases in length relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

14. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in at least one region of up to 150 bases in length relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

15. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in at least one region of up to 100 bases in length relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

16. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein the modified coding sequence encodes an immunogen.

17. The injectable pharmaceutical composition of claim 16, wherein the immunogen is a pathogen derived protein or immunogenic fragment thereof.

18. The injectable pharmaceutical composition of claim 16, wherein the immunogen is a fusion protein that includes a pathogen derived protein or immunogenic fragment thereof.

19. The injectable pharmaceutical composition of claim 16, wherein the immunogen is a cancer antigen or immunogenic fragment thereof.

20. The injectable pharmaceutical composition of claim 16, wherein the immunogen is a fusion protein that includes a cancer antigen or immunogenic fragment thereof.

21. The injectable pharmaceutical composition of claim 16, wherein the immunogen is an autoimmune disease associated protein or immunogenic fragment thereof.

22. The injectable pharmaceutical composition of claim 16, wherein the immunogen is a fusion protein that includes an autoimmune disease associated protein or immunogenic fragment thereof.

23. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein the modified coding sequence encodes a non-immunogenic therapeutic protein.

24. The injectable pharmaceutical composition of claim 23, wherein the non-immunogenic therapeutic protein is selected from the group consisting of cytokines, growth factors, blood products, and enzymes.

25. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein the modified coding sequence comprises dispersed modifications.

26. The injectable pharmaceutical composition of claim 25, wherein the dispersed modifications are at least two

modified coding sequences of up to 200 bases in length alternating with regions of native coding sequence.

27. The injectable pharmaceutical composition of claim 25, wherein the dispersed modifications are at least two modified coding sequences of up to 150 bases in length alternating with regions of native coding sequence.

28. The injectable pharmaceutical composition of claim 25, wherein the dispersed modifications are at least two modified coding sequences of up to 100 bases in length alternating with regions of native coding sequence.

29. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the last 200 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

30. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the last 150 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

31. The injectable pharmaceutical composition of claim 9, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the last 100 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

32. A recombinant viral vector comprising a nucleic acid molecule that includes a modified coding sequence encoding a protein operably linked to regulatory elements, wherein the modified coding sequence comprises a higher AT or AU content relative to the AT or AU content of the native coding sequence.

33. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the first 200 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

34. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the first 150 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

35. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the first 100 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

36. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in at least one region of up to 200 bases in length relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

37. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in at least one region of up to 150 bases in length relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

38. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in at least one region of up to 100 bases in length relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

39. The recombinant viral vector of claim 32, wherein the modified coding sequence encodes an immunogen.

40. The recombinant viral vector of claim 39, wherein the immunogen is a pathogen derived proteins or immunogenic fragment thereof.

41. The recombinant viral vector of claim 39, wherein the immunogen is a fusion protein that includes a pathogen derived protein or immunogenic fragment thereof.

42. The recombinant viral vector of claim 39, wherein the immunogen is a cancer antigen or immunogenic fragment thereof.

43. The recombinant viral vector of claim 32, wherein the immunogen is a fusion protein that includes a cancer antigen or immunogenic fragment thereof.

44. The recombinant viral vector of claim 39, wherein the immunogen is an autoimmune disease associated protein or immunogenic fragment thereof.

45. The recombinant viral vector of claim 39, wherein the immunogen is a fusion protein that includes an autoimmune disease associated protein or immunogenic fragment thereof.

46. The recombinant viral vector of claim 32, wherein the modified coding sequence encodes a non-immunogenic therapeutic protein.

47. The recombinant viral vector of claim 46, wherein the non-immunogenic therapeutic protein is selected from the group consisting of cytokines, growth factors, blood products, and enzymes.

48. The recombinant viral vector of claim 32, wherein the modified coding sequence comprises dispersed modifications.

49. The recombinant viral vector of claim 48, wherein the dispersed modifications are at least two modified coding sequences of 200 bases in length alternating with regions of native coding sequence.

50. The recombinant viral vector of claim 48, wherein the dispersed modifications are at least two modified coding sequences of 150 bases in length alternating with regions of native coding sequence.

51. The recombinant viral vector of claim 48, wherein the dispersed modifications are at least two modified coding sequences of 100 bases in length alternating with regions of native coding sequence.

52. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the last 200 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

53. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the last 150 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

54. The recombinant viral vector of claim 32, wherein said modified coding sequence comprises a higher AT or AU content in the last 100 bases relative to the AT or AU content of the native nucleic acid sequence.

* * * * *

IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response *in vivo*, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both

René Rückert¹, Udo Herz², Ralf Paus², Daniela Ungureanu¹, Thomas Pohl¹, Harald Renz³ and Silvia Bulfone-Paus¹

¹ Institute for Immunology, University Hospital Benjamin Franklin, Free University Berlin, Berlin, Germany

² Department of Clinical Chemistry and Biochemistry, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany

³ Department of Dermatology, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany

We have explored how IL-15 influences Th1 or Th2 type immune responses *in vivo*. Intraperitoneal application of an IL-15-IgG2b fusion protein (FP) to mice did neither significantly affect the footpad swelling nor the production of hemagglutinating antibodies in a delayed type hypersensitivity reaction to sheep red blood cells. In contrast, in an established murine Th2 model of sensitization to ovalbumin (OVA), IL-15-IgG2b FP plus OVA sensitization resulted in massively accelerated and enhanced allergen-specific IgE and IgG1 antibody production. *In vitro*, stimulation of spleen cells from OVA-sensitized mice with OVA+IL-15 or OVA+IL-15-IgG2b resulted in a significantly enhanced IgE production. IL-4 secretion was significantly induced by IL-15 but not by IL-15-IgG2b. An IL-2-IgG2b FP with the same Fc tail as the IL-15-IgG2b FP was used as control in both models. In striking contrast to the IL-15-IgG2b FP, IL-2-IgG2b significantly inhibited the Th2 type antibody production *in vivo*. The current study suggests that IL-15-IgG2b may be employed as a potent accelerator and enhancer of Th2 type immune responses *in vivo*, while IL-2-IgG2b can suppress the latter.

Key words: IL-15 / IL-2 / Fusion protein / Th1 / Th2

Received	24/6/98
Revised	27/7/98
Accepted	28/7/98

1 Introduction

IL-15 belongs to the four-helix bundle cytokine family and has many functional properties in common with IL-2, since the receptor complexes for IL-15 and IL-2 share two subunits, the β and γ chain [1–6]. For example, both IL-2 and IL-15 promote activation, proliferation and cytokine release of T cells [7–12] as well as the proliferation and polyclonal Ig secretion of activated B cells [13]. In spite of these similarities to IL-2, IL-15 is also quite distinct from IL-2 in its broad constitutive or inducible gene transcription pattern in multiple cell types and tissues [2–4, 14–16], and in its unusually tightly controlled secretion [17]. IL-15 also binds to its own high-affinity receptor, the IL-15 receptor α chain [18–19]. In addition,

we have shown that IL-15 inhibits apoptosis of T and B cells *in vitro* and *in vivo* and rescues mice from lethal anti-Fas-induced hepatic failure by suppressing hepatocyte apoptosis [20].

Some previous reports would seem to be in line with the concept that IL-15 is a Th1 type cytokine. IL-15 primes naive CD4⁺ T cells for subsequent IFN- γ production [21], and antigen-specific responses in T cells from HIV-infected individuals show enhanced IFN- γ release and expansion of HIV-specific CTL, when stimulated with high doses of IL-15 [22–23]. However, IL-15 reportedly also induces IL-5 production by allergen-specific human T cell clones [9]. Thus, IL-15 may also influence Th2 immune responses.

In the current pilot study, we were interested in exploring the role of IL-15 as a modulator of Th1/Th2 immune responses *in vivo* (reviewed in [24–26]) compared to IL-2. Simultaneously, we wished to test whether the administration of both cytokines in the form of chimeric cytokine-Ig fusion proteins (FP), which employ the Fc tail

[18522]

Abbreviations: FP: Fusion protein IL-15-IgG2b FP: Fusion protein consisting of human IL-15 and the murine IgG2b tail CHS: Contact hypersensitivity

45

for prolonged half-life *in vivo*, enhance the described *in vitro* properties of IL-15 and IL-2. This was done under the perspective that possibly both FP might be put to distinct clinically uses, depending on whether a Th1 or Th2 response pattern should be suppressed or enhanced.

Two well-characterized murine Th1 and Th2 models were selected for this study. The DTH reaction in mouse footpad to SRBC antigens was used as a prototype T cell-dependent Th1 type immune response model. Sensitization to SRBC is accompanied by the homing of antigen-specific cells to peripheral lymphoid tissues. Once activated, upon local antigen challenge in the footpad, these cells migrate to the site of challenge and induce a swelling reaction, which correlates with the extent of the DTH reaction [27].

Allergic sensitization to OVA was employed as a Th2 model [28, 29]. I.p. injection of the soluble protein OVA together with adjuvants induces a T cell-dependent Th2 immune response, with priming of T cells, for IL-4 and IL-5 production and the induction of high IgE and IgG1 production by B cells, depending on IL-4 action [28]. This cytokine pattern and the secretion of IgE, which binds to appropriate high-affinity receptors on peripheral tissue mast cells (e.g. in skin and lung mucosa) resembles closely the human allergic phenotype, and has been utilized as a model for atopic dermatitis and allergic asthma [29].

To prolong the half-life of IL-15 by preventing rapid renal clearance of the low molecular weight cytokine, IL-15 was fused to a murine IgG2b molecule [30], and the IL-15-IgG2b FP [20] was employed instead of the cytokine alone. A previously reported IL-2-IgG2b FP was used as a control, since it shares the same Fc tail, and since we had demonstrated that it strongly suppresses the DTH response against SRBC in mice [31].

2 Results

2.1 The DTH reaction to SRBC is unaffected by IL-15-IgG2b treatment

We had previously demonstrated that IL-2-IgG2b FP binds to FcR and supports IL-2-dependent cell proliferation, but does not mediate lysis of IL-2R-positive cells in the presence of murine complement *in vitro* [31]. *In vivo*, however, IL-2-IgG2b FP strongly suppresses footpad swelling after SRBC injection in sensitized mice, thus acting as a functional IL-2 antagonist [31]. In view of the shared receptor components for IL-15 and IL-2, and considering the functional similarities between these cytokines with respect to T cell activation described

above, we asked whether this Th1 response is also suppressed by IL-15-IgG2b *in vivo*.

C57BL/6 mice were sensitized i.v. to SRBC and challenged 5 days after immunization by SRBC injection into the hind footpad to induce a DTH response. The footpad swelling reaction was analyzed 24 and 48 h after SRBC challenge in mice which had been treated from day 1, 2 h before the time of immunization until 12 h after challenge on day 5 with IL-15-IgG2b FP or IL-2-IgG2b FP.

As shown in Fig. 1A, IL-15-IgG2b FP had no significant effect on footpad swelling compared to the positive control ($p > 0.05$). Measuring of footpad swelling 48 h after challenge gave results comparable to the 24 h measurement for all treatment groups (not shown). Compared to positive controls, injection of the IL-15-IgG2b FP also left the production of 19S (IgM) and 7S+19S (total) hemagglutinating antibodies unaffected (Fig. 1B). Injection of IL-15 cytokine alone (250 ng every 12 h) also did not affect the DTH response (data not shown).

In contrast, the IL-2-IgG2b FP suppressed both cellular and humoral immune responses after immunization with SRBC. In accordance with our previous observations, injection of murine IgG2b, or of IL-2 alone, had no influence on footpad swelling and hemagglutinating antibody production compared to controls [31].

Thus, these experiments did not produce any positive evidence for an involvement of IL-15 in this Th1 immune response pattern, neither as functional antagonist, nor as a promoter of the Th1 response *in vivo*. This is in marked contrast to IL-2-IgG2b FP, which acts as a functional antagonist to endogenous IL-2 activity [31].

2.2 IL-15-IgG2b accelerates and enhances allergen-specific IgE and IgG antibody production *in vivo*, while IL-2-IgG2b suppresses it

To compare, next, IL-2-IgG2b and IL-15-IgG2b in the modulation of allergic sensitization to OVA in mice, the two FP were injected i.p. twice daily, starting 2 h before sensitization on day 1 until day 10, in parallel to OVA sensitization on day 1, 7 and 14 [29]. Neither the effects of IL-2-IgG2b nor of IL-15-IgG2b FP had previously been tested in this Th2 model.

Treatment with IL-15-IgG2b substantially accelerated the induction of OVA-specific IgE/IgG1 production in this model: IL-15-IgG2b-treated mice showed a 20-fold higher OVA-specific IgE titer ($p < 0.01$), and up to 50-fold elevated OVA-specific IgG1 serum titers ($p < 0.01$)

48

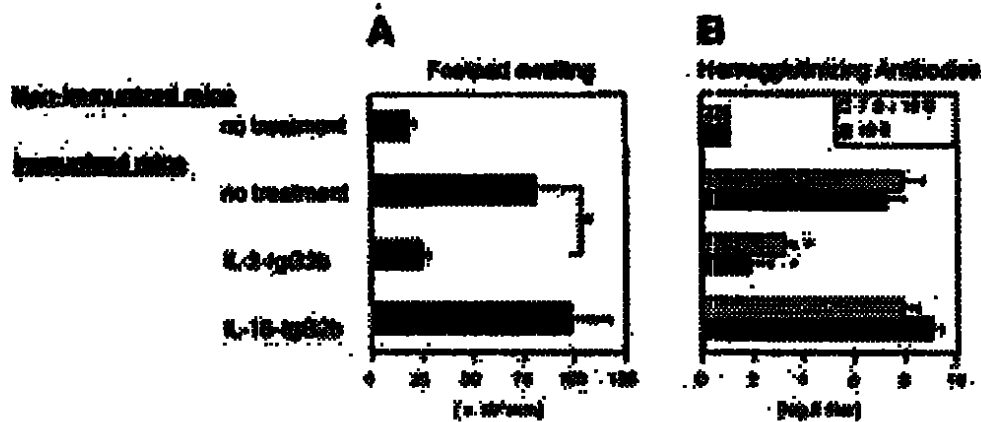


Figure 1. IL-15-IgG2b does not affect DTH footpad swelling reaction and production of hemagglutinating antibodies. (A) Mice were left unimmunized or were immunized i.v. with 4×10^8 SRBC at day 1. Immunized mice were left untreated as positive control, treated with 40 μ g IL-15-IgG2b or with 20 μ g IL-2-IgG2b l.p. every 12 h from day 1 until challenge on day 8. Challenge on day 8 was performed by injection of SRBC in the left hind footpad, the right footpad was injected with saline to calculate the non-specific swelling reaction; swelling was determined 24 h after challenge with a micrometer. Non-immunized (negative control group) mice were challenged without prior immunization. (B) Serum titers of hemagglutinating total 79+198 (gray bar) and 198 (black bar) antibodies against SRBC were determined at day 8 after immunization. Pooled data from three independent experiments, all of which yielded highly similar results, are shown (mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$, Mann-Whitney-U test compared to sensitized, non-FP-treated mice). Footpad swelling and antibody response in mice treated only with IL-2, IL-15, or IgG2b did not differ significantly from vehicle-treated, immunized controls ($p > 0.05$; not shown).

on day 10, compared to untreated, OVA-sensitized control mice, where antibody production just initiated at this early time point after OVA immunization (Fig. 2). Even on day 16, i.e. 6 days after discontinuation of FP administration, the IgE/IgG1 titers remained significantly elevated, compared to mice which did not receive the FP (Fig. 2). Allergen-specific IgM titers were similarly elevated in IL-15-IgG2b-treated and IL-2-IgG2b-treated mice on day 7 and suppressed on day 10 compared to untreated mice (Fig. 2).

On the contrary, OVA-specific IgE production after IL-2-IgG2b FP treatment was highly significantly suppressed on day 16, i.e. 6 days after FP injections had been discontinued on day 10, IgG1 titers remained at the baseline level during the treatment on day 10 and were also highly significantly suppressed 6 days after cessation of IL-2-IgG2b FP injections (Fig. 2). The untreated, OVA-sensitized mice showed the expected exponential increment of IgE and IgG1 until day 16 (Fig. 2). IgM production of untreated, sensitized mice peaked at day 10 and declined after 16 days to levels comparable to those of FP-treated mice. Instead, IL-2-IgG2b FP initially slightly induced IgM production, followed by significant suppression on day 10 (Fig. 2). Control injections of murine IgG2b alone had no effect on the antibody response to OVA sensitization (data not shown).

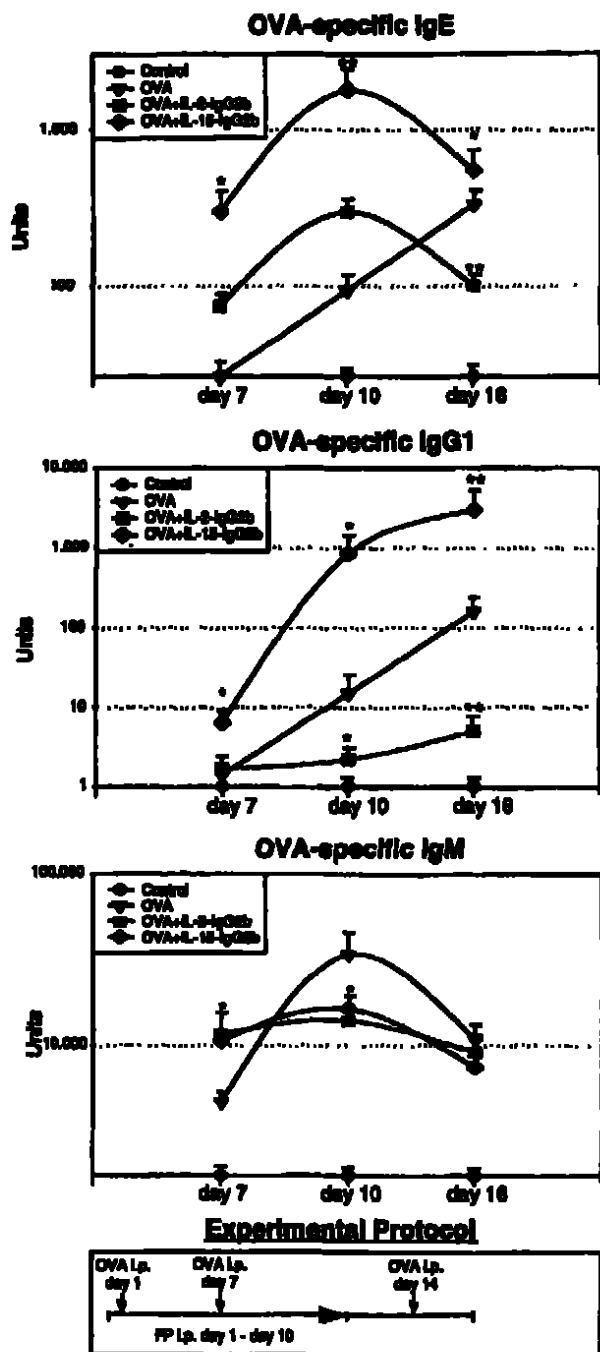
In summary, while IL-15-IgG2b FP significantly stimulated a Th2 antibody response pattern in this mouse model, IL-2-IgG2b FP inhibited it.

2.3 IL-15 enhances total IgE production by OVA-sensitized spleen cells *in vitro*

To analyze whether IL-15 stimulates a similar Ig synthesis *in vitro* as observed *in vivo* (Fig. 2), spleen cells from OVA-sensitized mice were analyzed for Ig production *in vitro*. These experiments were designed to explore whether IL-15 stimulation *in vitro* also induces a priming of B cells for a Th2 type pattern of antibody production (i.e. IgE), or whether the dramatically enhanced antibody titers *in vivo* after IL-15-IgG2b FP treatment simply reflect non-specific immunostimulatory properties of IL-15. Spleen cells from OVA-sensitized and unimmunized control mice were incubated with medium, OVA, OVA+IL-2, OVA+IL-15, OVA+IL-2-IgG2b FP, or OVA+IL-15-IgG2b FP for 10 days, and total IgE titers were determined by ELISA.

OVA stimulation of splenocytes from OVA-sensitized mice increased the Th2 type IgE antibody production *in vitro*. Addition of either IL-15 or IL-2 significantly enhanced this antibody production *in vitro* ($p < 0.05$), compared to OVA stimulation alone (Fig. 3). Co-

47



stimulation with OVA+IL-15-IgG2b also increased the IgE production highly significantly *in vitro* ($p < 0.01$) as had been observed *in vivo*. Addition of IL-2-IgG2b also stimulated IgE production significantly above baseline levels (Fig. 3). This stimulation of a Th2 type IgE production by either IL-15 or IL-15-IgG2b *in vitro* supports the concept that IL-15 can induce and/or promote a Th2

Figure 2 IL-2-IgG2b suppresses while IL-15-IgG2b enhances production of OVA-specific Ig *in vivo*. Mice were immunized by i.p. injections of OVA on day 1, 7, and 14 and were either left untreated (OVA) or were treated with 20 μ g IL-2-IgG2b (OVA+IL-2-IgG2b) or with 40 μ g IL-15-IgG2b (OVA+IL-15-IgG2b) twice daily from day 1 to 10. Controls were left unimmunized. Serum samples were collected on days 7, 10 and 18 after immunization and analyzed for OVA-specific IgE, IgG1 and IgM by ELISA. Units were calculated by comparison to a previously generated internal standard serum from OVA-sensitized BALB/c mice [28]. As expected, control mice produced no OVA-specific antibodies, so the values for the control group were set to the detection limit of the ELISA. One representative out of three independent experiments, which gave similar results, is shown (mean $\pm$ SEM of five mice/group, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ compared to OVA-sensitized, untreated mice by Mann-Whitney-U test).

immune response pattern, e.g. by providing a potent co-stimulatory signal to sensitized B cells to initiate and/or enhance Th2 antibody production *in vitro* and *in vivo*.

2.4 IL-15, but not IL-15-IgG2b, stimulates IL-4 secretion *in vitro*

As a first step towards dissecting how IL-15 may promote Th2 responses, the effect of IL-15 on the release of T cell-derived cytokines *in vitro* was analyzed and compared to that of IL-2. Production of IL-4 and IFN- γ *in vitro* was measured, since these cytokines are used to define Th0, Th1 or Th2 effector functions [32, 33]. For this purpose, spleen cells from OVA-sensitized or unimmunized control mice, none of which had been treated with the FP *in vivo*, were stimulated *in vitro* with medium, OVA, OVA+IL-2, OVA+IL-15, OVA+IL-2-IgG2b FP, or with OVA+IL-15-IgG2b FP.

In vitro incubation of spleen cells sensitized *in vivo* with OVA induced the expected IL-4 production, while the combination of OVA plus IL-2 or IL-15 was more potent in stimulating significant IL-4 production, compared to OVA stimulation alone, with a maximal IL-4 release seen after OVA+IL-2 addition (Fig. 4). Unexpectedly, co-stimulation with OVA and IL-2-IgG2b FP or IL-15-IgG2b FP could not enhance the IL-4 production *in vitro* above the levels of stimulation achieved with OVA alone (Fig. 4). T cells from unimmunized mice produced no detectable IL-4. These data suggest that the stimulation of Th2 type Ig production by IL-15-IgG2b FP *in vivo* is unlikely to be mediated via an enhanced release of IL-4.

66

48

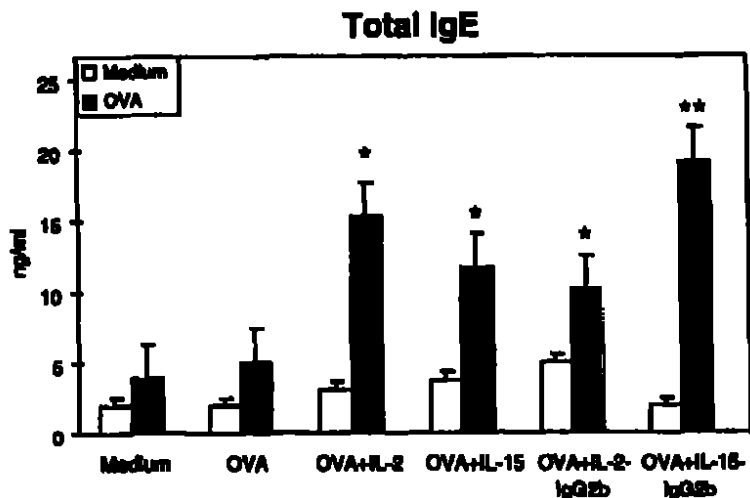


Figure 3. IL-15 induces IgE production by OVA-specific B cells *in vitro*. Spleen cells from four unsensitized control, or four OVA-sensitized, non-FP-treated mice were incubated in triplicates for 20 days with medium, 25 µg/ml OVA, OVA+ 10 ng/ml IL-2, OVA+ 10 ng/ml IL-15, OVA+ 100 ng/ml IL-2-IgG2b or OVA+ 100 ng/ml IL-15-IgG2b. Total IgE production was determined by ELISA. The mean ± SD from two representative out of three separate experiments, all of which yielded similar results, is shown. Significance was analyzed in comparison to OVA-stimulated spleen cells by Mann-Whitney-U test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

A comparison of the IFN-γ release *in vitro* after stimulation of spleen cells revealed interesting functional differences between IL-2 and IL-15. Only the administration of OVA in combination with IL-2 induced high IFN-γ production by both OVA-sensitized ($p < 0.05$) and unsensitized control spleen cells. That IL-15 did not stimulate IFN-γ release, even though the IL-15R shares the β- and γ-chains with the IL-2R [2, 3, 8], further suggests the existence of important functional differences between both cytokines [7].

tized control spleen cells. That IL-15 did not stimulate IFN-γ release, even though the IL-15R shares the β- and γ-chains with the IL-2R [2, 3, 8], further suggests the existence of important functional differences between both cytokines [7].

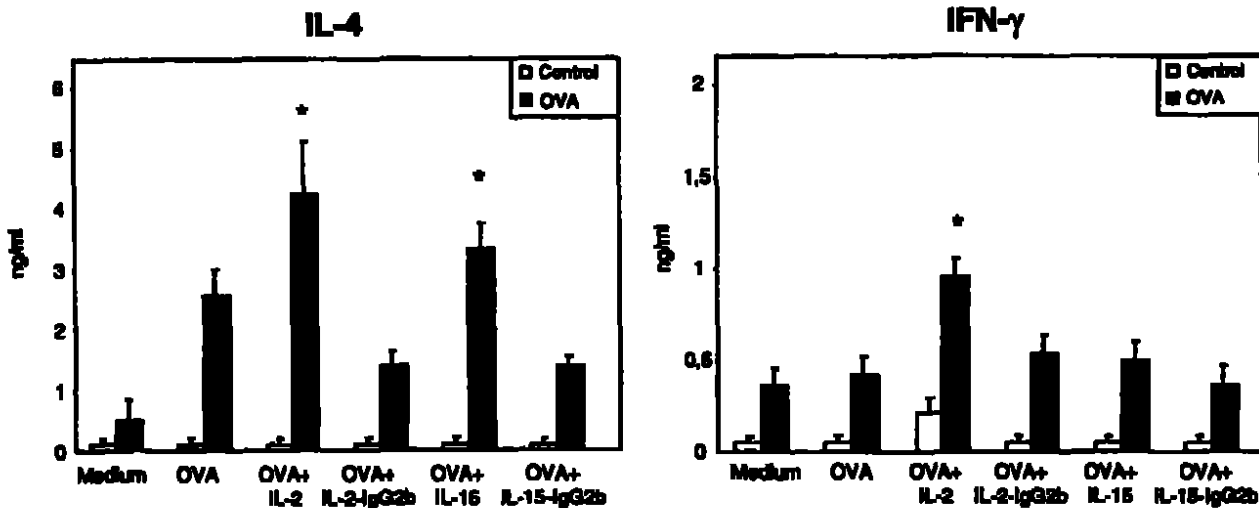


Figure 4. IL-15 stimulates IL-4 but not IFN-γ production *in vitro*. Cells from four unsensitized control mice (open bars) or from four OVA-sensitized, non-FP-treated mice (black bars) were stimulated in triplicate for 5 days with medium, 25 µg/ml OVA, OVA+ 10 ng/ml IL-2, OVA+ 10 ng/ml IL-15, OVA+ 100 ng/ml IL-2-IgG2b, or OVA 100 ng/ml IL-15-IgG2b FP. The detection limit for IL-4 and IFN-γ was 100 pg/ml. Experiments were repeated three times, and the data were pooled, since all experiments gave highly comparable results. Shown is the mean ± SD. (* $p < 0.05$; Mann-Whitney-U test compared to OVA stimulation alone).

49

3 Discussion

Here we show that IL-15-IgG2b FP accelerates and enhances the induction of allergen-specific IgE and IgG antibody production in an *in vivo* model of allergic sensitization, but fails to modulate a DTH response *in vivo*, while IL-2-IgG2b FP inhibits both.

Intriguingly, coupling of the same IgG2b tail to two distinct cytokines had dramatically different effects on the biological activity of the new FP, compared to those of the original cytokines. While IL-15-IgG2b FP reproduced and even enhanced *in vivo* the effects seen for IL-15 alone *in vitro*, IL-2-IgG2b FP rather acted as a functional antagonist to IL-2 *in vivo*.

That injection of IL-15-IgG2b did not significantly modulate a standard Th1 response (DTH) is in line with recent data from our laboratory [34] obtained using a second murine Th1 model, namely T cell-mediated contact hypersensitivity (CHS) response to picryl chloride [35]. IL-15-IgG2b FP, after systemic or local injection, did not affect the ear swelling reaction to hapten challenge, whereas IL-2-IgG2b FP significantly suppressed this reaction [34]. That IL-15-IgG2b did not alter the Th1 response in both these murine models certainly does not rule out a role of endogenous IL-15 in the control of Th1 responses. For example, the constitutive amount of endogenous IL-15R α ligand present in both models may have fully sufficed to allow the development of a maximal DTH or CHS response, which IL-15-IgG2b FP was unable to stimulate any further. Thus, all one can conclude from the lack of modulatory effects seen by IL-15-IgG2b administration in these Th1 models is that this FP, in striking contrast to the IL-2-IgG2b FP [31], has no antagonistic effects on its cognate receptor *in vivo*.

The previously reported *in vitro* effect of IL-15 on activated B cells, i.e. induction of a polyclonal Ig production and proliferation of activated B cells *in vitro* [13, 36], corresponds well to the enhancement of IgE and IgG1 observed here (see Figs. 2 and 3); the IgM production was elevated after 7 days FP treatment, suggesting the initial stimulation of B cell activity. However, the IL-2-IgG2b FP may block the class switch to IgG or IgE, therefore suppressing significantly the IgG1 and IgE titers, while IL-15-IgG2b FP accelerates the H-chain gene rearrangement, resulting in massively enhanced IgE and IgG1 production already 7 days after the first OVA sensitization. It now remains to be clarified whether this elevated IgE/IgG1 represents an exclusively co-stimulatory effect of IL-15 on Th2-primed B cells, which have already undergone the IL-4/IL-13-mediated Ig class switch to IgE/IgG1, compared to the polyclonal stimulation Ig synthesis of IL-2 [37]. The stimulation of IgE/IgG1

production by IL-15-IgG2b *in vivo* suggests a Th2-specific effect on B cell function. However, our *in vitro* data (Fig. 4) suggest that induction of IL-4 release is unlikely to play a major role in this phenomenon. Therefore it will be interesting to dissect whether IL-15-IgG2b itself can actually induce a B cell isotype class switch.

Preliminary FACS data suggest that the IL-15-IgG2b FP binds not only via IL-15R but also via FcR to B cells, since blocking of the IgG tail of the FP with an antibody significantly reduced the binding of the IL-15-IgG2b FP to B cells (Bulfone-Paus et al., unpublished observation). Such a reduction of binding was not seen with the IL-2-IgG2b FP. Since the IL-15-IgG2b FP binds to B cell FcR, it is conceivable that FP-mediated cross-linking of FcR with components of the IL-15R promotes the activation or class switch of B cells. However, our data indicate that the modest effect on antibody production shown *in vitro* upon IL-15 stimulation can be strongly augmented by the use of IL-15-IgG2b *in vivo* (compare Figs. 2 and 4). This might be mediated by binding of IL-15-IgG2b FP to other IL-15R- and/or FcR-expressing cell populations (e.g. antigen-presenting dendritic cells), which are activated by the FP and provide potent co-stimulatory signals to B cells *in vivo*.

Given the potent inhibitory effects of IL-15 on B cell apoptosis *in vitro* and *in vivo* [20], prevention of B cell apoptosis may also result in an enhanced B cell proliferation with a concomitantly higher Ig production.

The IL-2-IgG2b FP, in contrast, abolished exclusively the antigen-specific immune response *in vivo*, while it induced in the same models unspecific T and B cell activation. IL-2-IgG2b FP-treated mice showed significantly enhanced expression of the T cell activation marker CD25 (IL-2R α) as well a threefold proliferative response compared to OVA-sensitized, non-FP-treated mice *ex vivo* after mitogen (not after antigen) stimulation (Bulfone-Paus et al., unpublished observations). However, the exact mechanisms of IL-2-IgG2b FP-mediated immunosuppression remain to be clarified. Inhibition of T cell homing to the inflammation site after antigen challenge or induction of IL-2-mediated activation-induced cell death after antigen restimulation [38] are likely to be the reason for T cell unresponsiveness. In B cells, IL-2-dependent suppression of Ig class switch to IgE/IgG1 may be responsible for the substantial inhibition in the Th2 OVA model [39].

Though the underlying mechanisms await systematic analysis, the observations of this pilot study suggest that the IL-15-IgG2b FP may be exploited clinically as a tool for boosting *in vivo* humoral immune reactions such as the antibody response in helminth infection, or vaccina-

R

59

tion efficiency [40]. In contrast, because of its potent immunosuppressive properties *in vivo* (Fig. 1 and 2, [31, 34]), IL-2-IgG2b FP should be systematically explored as a clinically potentially useful suppressor of deleterious or unwanted Th1 or Th2 type immune responses.

4 Materials and methods

4.1 Fusion proteins

The IL-15-IgG2b FP and the IL-2-IgG2b FP were produced as previously described [20, 31]. For *in vivo* and *in vitro* use, both FP were diluted in PBS without addition of any stabilizing agent, and sterile filtered.

4.2 Th1 model of DTH reaction to SRBC

The assay followed our previously described protocol [31]. Briefly, 7–8-week-old C57BL/6 mice (five mice/group) were obtained from breeding colonies of the Free University Berlin animal facilities. All mice were sensitized by i.v. injection of 4×10^6 SRBC in 100 μ l PBS. To assess the DTH reaction, mice were challenged 5 days after immunization by injection of 2×10^6 SRBC in 50 μ l PBS intracutaneously into the left hind footpad (specific swelling). Non-immunized mice were injected with the same dose of SRBC to determine unspecific swelling, as described [31]. Forty micrograms of the IL-15-IgG2b FP or 20 μ g of the IL-2-IgG2b FP were injected i.p. every 12 h in 200 μ l PBS for 5 days, until 12 h after the antigen challenge. The amount of the injected FP was chosen based on the results from our previous studies [20, 31]. Control groups were injected with murine IgG2b (8 μ g in 200 μ l PBS) or single IL-2 (5 μ g in 200 μ l PBS) or IL-15 (0.25 μ g/200 μ l PBS) alone, but no differences to vehicle control-injected mice were observed. Swelling of the footpad was measured 24 h and 48 h after challenge with a dial gauge caliper (Oditest OD 100 T 50; H. C. Kroplin, Schöcktern, Germany). All experiments were repeated three times with five mice/group, and data were pooled, since all experiments yielded highly comparable results.

Six days after primary immunization, serum was collected and hemagglutinin titers to SRBC were measured as described [31]. In brief, the serum was incubated at 56 °C for 30 min and diluted using 150 mM NaCl with or without 0.78 % 2-ME in serial log 2 dilutions. Of a 0.5 % SRBC suspension, 200 μ l was added to 200 μ l of the serum dilutions, incubated at 37 °C for 30 min at room temperature for 2 h, and at 4 °C for additional 12 h. The serum hemagglutinin titers are the highest log 2 dilution steps in which hemagglutination could still be determined.

4.3 Th2 model of allergic sensitization to OVA

The previously described mouse model of allergic sensitization to OVA was used, employing BALB/c mice [28]. The following study groups, each consisting of five female, 7–8-week-old, BALB/c mice from the breeding facilities of the Free University Berlin were analyzed.

Control animals were injected with 200 μ l PBS (= FP vehicle) twice a day. OVA: mice were sensitized to OVA (10 μ g adsorbed to 1.5 mg Al(OH)₃/injection; OVA grade V, Sigma, Deisenhofen, Germany) by i.p. injections on day 1, 7 and 14. OVA+IL-15-IgG2b: mice were sensitized to OVA and were treated i.p. every 12 h, starting 2 h before sensitization from day 1 until day 10, with 40 μ g of the IL-15-IgG2b FP in 200 μ l PBS. OVA+IL-2-IgG2b: mice were sensitized to OVA and were treated i.p. every 12 h, starting 2 h before sensitization from day 1 until day 10 with 20 μ g of the IL-2-IgG2b FP in 200 μ l PBS. The amount of the injected FP was chosen based on our previous studies [20, 31]. Additional controls were injected with IgG2b alone (8 μ g in 200 μ l PBS). Serum samples were collected on day 7, 10 and 16 for determination of serum Ig titers as explained below. All experiments were repeated three times.

4.4 Ig ELISA

Determination of serum OVA-specific IgE, IgG1 and IgM titer and of total IgE titers in serum and total IgE in cell culture supernatants was performed by ELISA, as previously described [29]. Allergen-specific antibody titers of the serum samples were related to standard pool serum, generated from hyperimmunized BALB/c mice and arbitrarily assigned the value of 2000 U/ml [29]. The detection limit was 1.9 ng/ml for total IgE, and 1 U for OVA-specific antibodies.

4.5 Cell culture and cytokine ELISA

Single-cell suspensions of spleen cells from unsensitized control mice and from OVA-sensitized mice (1×10^6 cells; four mice/group; experiments were repeated three times) were incubated with either medium (RPMI 1640 supplemented with 10 % heat-inactivated FCS, 5 mM glutamine 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and stimulated with 10 μ g/ml OVA (Grade VI, Sigma), OVA+ 10 ng/ml IL-2, OVA+ 10 ng/ml IL-15, OVA+ 100 ng/ml IL-2-IgG2b or OVA+ 100 ng/ml IL-15-IgG2b. Culture supernatants were harvested after 5 days for determination of cytokine production, and after 10 days for total IgE production in the supernatants. IL-4 and IFN- γ in culture supernatants were measured by ELISA using monoclonal rat anti-mouse IL-4 (1 μ g/ml) or IFN- γ (5 μ g/ml) and biotinylated secondary monoclonal anti-mouse IL-4 and anti-mouse IFN- γ antibodies (Pharmingen, Hamburg, Germany) following the manufacturer's instructions. Detection limits were 100 pg/ml for IL-4 and for IFN- γ , respectively.

78

4.8 Statistical analysis

Results are presented as mean values $\pm$ SD as indicated in figure legends. The Mann-Whitney-U test was used to determine the level of statistical significance ($p < 0.05$; $**p < 0.01$).

Acknowledgment: This work was supported by grants from the DFG to S. B.-P. and T. P. (SFB 508/C5), to R. P. (345/3-2), and to H. R. (Re 731/4-4).

5 References

- 1 Tagaya, Y., Bamford, R. N., De Filippis, A. P. and Waldmann, T. A., IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996, 4: 329–336.
- 2 Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. R., Watson, J. D., Anderson, D. M. and Giri, J. G., Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994, 264: 985–988.
- 3 Giri, J. G., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H. and Cosman, D., IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J. Leukoc. Biol.* 1995, 57: 769–788.
- 4 Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, P. A., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E. and Waldmann, T. A., A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T cell leukemia line, stimulated T cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 4935–4939.
- 5 De Jong, J. L. O., Farner, N. L., Widmer, M. B., Giri, J. G. and Sondel, P. M., Interaction of IL-15 with the shared IL-2 receptor β and γ_c subunit. *J. Immunol.* 1995, 155: 1339–1348.
- 6 Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D. and Anderson, D., Utilization of the β and α chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 1994, 13: 2822–2830.
- 7 Bultone-Paus, S., Dürkop, H., Paus, R., Krause, H., Pohl, T. and Onu, A., Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15. *Cytokine* 1997, 9: 507–513.
- 8 Bamford, R. N., Grant, A. J., Burton, J. D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E. and Waldmann, T. A., The interleukin (IL)-2 receptor β chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 4940–4944.
- 9 Mori, A., Suko, M., Kaminuma, O., Inoue, S., Ohmura, T., Nishizaki, Y., Nagahori, T., Asakura, Y., Hoshino, A., Okumura, Y., Sato, G., Ito, K. and Okudaira, H., IL-15 promotes cytokine production of human T helper cells. *J. Immunol.* 1996, 156: 2400–2405.
- 10 Wilkinson, P. C. and Liew, F. Y., Chemotaxis of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J. Exp. Med.* 1995, 181: 1255–1269.
- 11 Molnes, I., Al-Mughales, J., Field, M., Leung, B. P., Huang, F.-P., Dixon, R., Starrock, R. D., Wilkinson, P. C. and Liew, F. Y., The role of interleukin-15 in T cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nature Med.* 1996, 2: 175–182.
- 12 Nieto, M., del Pozo, M. A. and Sánchez-Madrid, F., Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26: 1302–1307.
- 13 Armitage, R. J., Macduff, B. M., Eisenman, J., Paston, R. and Grabstein, K. H., IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 1995, 154: 483–490.
- 14 Mohamedzadeh, M., Takashima, A., Dougherty, L., Knop, J., Bergstresser, R. R. and Cruz, Jr. P. D., Ultra-violet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. *J. Immunol.* 1995, 155: 4482–4486.
- 15 Quinn, L. S., Haugk, K. L. and Grabstein, K. H., Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 1995, 136: 3669–3672.
- 16 Kennedy, M. K. and Park, L. S., Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *J. Clin. Immunol.* 1996, 16: 134–143.
- 17 Onu, A., Pohl, T., Krause, H. and Bultone-Paus, S., Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J. Immunol.* 1997, 158: 255–262.
- 18 Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S. and Anderson, D. M., Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 1995, 14: 3654–3663.
- 19 Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometako, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Shapiro, D. N., Morris, S. W., Park, L. S. and Cosman, D., Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 29882–29889.

- 20 Buffone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Rückert, R., Krause, H. and Kunzendorf, U., Interleukin-15 protects from lethal apoptosis *in vivo*. *Nature Med.* 1997, 3: 1124-1128.
- 21 Seder, R. A., High-dose IL-2 and IL-15 enhance the *in vitro* priming of naive CD4⁺ T cells for IFN- γ but have differential effects on priming for IL-4. *J. Immunol.* 1998, 160: 2413-2422.
- 22 Seder, R. A., Grabstein, K. H., Berzofsky, J. A. and McDyer, J. F., Cytokine interactions in human immunodeficiency virus-infected individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL-12, and IL-15. *J. Exp. Med.* 1995, 182: 1067-1077.
- 23 Kanai, T., Thomas, E. K., Yasutomi, Y. and Letvin, N. L., IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. *J. Immunol.* 1996, 157: 3681-3687.
- 24 Moemann, T. R. and Coffman, R. L., Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989, 7: 145-173.
- 25 Constant, S. L. and Bottomly, K., Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: The alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 15: 297-322.
- 26 Romagnani, S., The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* 1997, 18: 253-256.
- 27 Luo, Y. and Dorf, M. E., Delayed-type hypersensitivity. In Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margules, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. (Eds.) *Current Protocols in Immunology*. Wiley, New York 1993, 4.5.1-4.5.5.
- 28 Renz, H., Ensaff, K., Lauffer, L., Kurie, R. and Gelfand, E. W., Inhibition of allergen-induced IgE and IgG1 production by soluble IL-4 receptor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995, 108: 48-54.
- 29 Herz, U., Braun, A., Rückert, R. and Renz, H., Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin. Exp. Allergy* 1997, 28: 625-634.
- 30 Harvill, E. T., Fleming, J. M. and Morrison, S. L., *In vivo* properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. *J. Immunol.* 1996, 157: 3165-3170.
- 31 Kunzendorf, U., Pohl, T., Buffone-Paus, S., Krause, H., Notter, M., Onu, A., Waltz, G. and Diamantstein, T., Suppression of cell-mediated and humoral immune response by an interleukin-2-immunoglobulin fusion protein in mice. *J. Clin. Invest.* 1996, 97: 1204-1210.
- 32 Moemann, T. R., Cherwinski, H. M., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L., Two types of murine helper T cell clone, I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986, 136: 2348-2357.
- 33 Cherwinski, H. M., Schumacher, J. H., Brown, K. D. and Moemann, T. R., Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 1987, 166: 1229-1244.
- 34 Rückert, R., Hofmann, U., Paus, R. and Buffone-Paus, S., A novel IL-2-IgG2b fusion protein suppresses contact-hypersensitivity reaction in mice. *Arch. Dermatol. Res.* 1997, 289: A42.
- 35 Hofmann, U., Tokura, Y., Nishijima, T., Takedawa and Paus, R., Hair cycle-dependent changes in skin immune functions: antigen associated depression of sensitization for contact hypersensitivity in mice. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 108: 598-604.
- 36 Trentin, L., Cerutti, A., Zambello, R., Sancetta, R., Tizzani, C., Facco, M., Adami, P., Rodeghiero, F., Agostini, C. and Semenzato, G., Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B cell chronic lymphoproliferative disorders. 1996. *Blood* 87: 3327-3335.
- 37 van Vlasselaer, P., Gascan, H., de Wael Malefyt, R. and de Vries, J. E., IL-2 and a contact-mediated signal provided by TCR alpha beta⁺ or TCR gamma delta⁺ CD4⁺ T cells induce polyclonal Ig production by committed human B cells. Enhancement by IL-6, specific inhibition of IgA synthesis by IL-4. *J. Immunol.* 1992, 148: 1674-1684.
- 38 Lenardo, M. J., Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991, 353: 858-861.
- 39 Nakarishi, K., Yoshimoto, T., Chu, C. C., Matsumoto, H., Hase, K., Nagai, N., Tanaka, T., Miyasaka, M., Paul, W. E. and Shinkai, S., IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG1 production *in vitro* and *in vivo*. *Int. Immunol.* 1995, 7: 259-268.
- 40 Carter, L. L. and Dutton, W. D., Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 1996, 8: 336-342.

Correspondence: Silvia Buffone-Paus, Institute for Immunology, University Hospital Benjamin Franklin, Free University Berlin, Hindenburgdamm 30, Haus 1A, D-12200 Berlin, Germany
 Fax: +49-30-8445-4613
 e-mail: buffone@zedat.fu-berlin.de

52

56

CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia

William G. Wierda, Mark J. Cantwell, Sandra J. Woods, Laura Z. Rassenti, Charles E. Prusack, and Thomas J. Kipps

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be made to express recombinant CD40-ligand (CD154) by transduction with a replication-defective adenovirus vector (Ad-CD154). Ad-CD154-transduced and bystander leukemia cells become highly effective antigen-presenting cells that can induce CLL-specific autologous cytotoxic T lymphocytes *in vitro*. This study investigated the immunologic and clinical responses to infusion of autologous Ad-CD154-CLL cells in patients with CLL. After a one-time bolus infusion of autolo-

gous Ad-CD154-transduced leukemia cells, there was increased or *de novo* expression of immune accessory molecules on bystander, noninfected CLL cells *in vivo*. Treated patients also developed high plasma levels of interleukin-12 and interferon- γ , the magnitude of which corresponded to absolute blood CD4⁺ T-cell counts before therapy. On average, patients experienced a greater than 340% increase in absolute blood T-cell counts within 1 to 4 weeks of treatment. Moreover, treatment increased the numbers of

leukemia-specific T cells, demonstrated by autologous ELISPOT assay and mixed lymphocyte reactions. These biologic effects were associated with reductions in leukemia cell counts and lymph node size. Treatment did not induce autoimmune thrombocytopenia or hemolytic anemia and no dose-limiting toxicity was observed. This approach may provide a novel and effective form of gene therapy for patients with this disease. (Blood. 2000;96:2817-2824)

© 2000 by The American Society of Hematology

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukemia in the United States.¹ It is characterized by progressive accumulation of well-differentiated malignant monoclonal B lymphocytes in blood, lymph nodes, liver, spleen, and marrow.² Progression of the disease is typified by increases in blood lymphocyte count; increases in the size of lymph nodes, liver, and spleen; and advancing anemia and thrombocytopenia. Although chemotherapy may palliate symptoms, there is no established cure. This necessitates development of new treatments with a different mechanism of action.

Several features of this disease suggest that immune-based strategies may have therapeutic potential. CLL B cells are slowly dividing, monoclonal B cells that express differentiation antigens, major histocompatibility complex (MHC) class I and II molecules, and surface immunoglobulin (Ig).^{3,4} The Ig molecules expressed by the CLL B cells have features that distinguish them from the Ig molecules expressed by normal, nonmalignant B cells, even when encoded by nonmutated Ig variable region genes.^{4,5} Also, complex cytogenetic abnormalities frequently accumulate over time in CLL B cells.^{6,7} These genetic differences could result in CLL-specific antigens that may be recognized by the host immune system.

However, despite expressing high levels of MHC class I and II molecules, CLL B cells are ineffective antigen-presenting cells (APCs). Indeed, CLL B cells are unable to stimulate even normal allogeneic T cells in a mixed lymphocyte reaction (MLR).⁸⁻¹² This is due in part to their lack of important costimulatory surface molecules, such as CD80 and CD86, which are necessary for efficient T-cell activation.^{9,14-16}

We found that activated T cells could induce CLL B cells to become effective APCs.⁹ This effect was mediated largely by the ligand for CD40, designated CD154. CD154 is a type II membrane glycoprotein that is expressed transiently by activated CD4⁺ T cells.¹⁷ Normally, CD154 engages CD40 on potential APCs, including B cells, monocytes, and dendritic cells, and induces expression of accessory surface molecules that are important in cognate costimulatory cell-cell interactions. CLL B cells express CD40 and also are induced to express *de novo* or enhanced amounts of CD54, CD70, CD80, CD86, and CD95, following CD40 ligation *in vitro*. Such phenotypic changes allow these cells to function as effective stimulators of allogeneic or autologous T cells in a mixed lymphocyte culture.¹⁸ Conceivably, such activated neoplastic B cells also may present tumor-associated antigens to autologous T cells, allowing for the immune rejection of tumor, as recently observed in animal models of B-cell lymphoma.^{19,20}

The CLL B cells can be transduced *in vitro* with high-titer, replication-defective adenovirus vector to express high levels of transgene.²¹ A replication-defective adenovirus vector was constructed using serotype 5 adenovirus in which the E1 region of the virus genome was replaced with the gene encoding murine CD154 flanked in the 5' direction with a heterologous cytomegalovirus (CMV) promoter, and in the 3' direction with a bovine polyadenylation signal (Ad-CD154). Substantial numbers of CLL B cells can be transduced *in vitro* to express the CD154 transgene using this adenovirus vector.¹⁸ Expression of CD154 transgene by CLL B cells stimulates exposure of these cells to activated T cells and induces leukemia cell expression of immune costimulatory surface

From the Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, and the UCSD Human Gene Therapy Program, University of California-San Diego, La Jolla, CA; Immunogenex, Inc, La Jolla, CA; and Molecular Medicine/LLC, UCSD, La Jolla, CA.

Submitted March 18, 2000; accepted June 20, 2000.

Supported in part by National Institutes of Health grant M01 RR00827, PO1 CA81834, R37 CA48870 (T.J.K.), and the California Division-American Cancer Society Fellowship #4-22-88 (W.G.W.).

Reprints: Thomas J. Kipps, Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, University of California-San Diego, 8500 Gilman Dr, La Jolla, CA 92093-0663; e-mail: tkipps@ucsd.edu.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2001 by The American Society of Hematology

54

molecules. In addition, CLL B cells that express CD154 can induce noninfected, bystander CLL B cells to express such surface molecules. When tested *in vitro*, Ad-CD154-infected CLL B cells, but not CLL cells infected with an adenovirus vector encoding an irrelevant transgene, could stimulate allogeneic as well as autologous T cells in an MLR, thereby inducing T-cell proliferation and production of interferon- γ (IFN- γ). Moreover, Ad-CD154-infected CLL B cells, but not CLL cells infected with a control adenovirus vector, could induce generation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) against noninfected autologous CLL B cells *in vitro*.¹⁸ Because these *in vitro* studies suggested that Ad-CD154 potentially could elicit a therapeutic host antileukemia immune response, we performed a phase I dose-escalation study assessing the safety of administering a single intravenous infusion of autologous Ad-CD154-transduced leukemia cells to patients with B-cell CLL.

Patients, materials, and methods

Patients and CLL B-cell transduction

Eleven patients were entered into the study (Table 1). All patients had progressive intermediate or high-risk CLL by the modified Rai criteria. Four of the patients previously were treated with chemotherapy. All patients had performance status of 0 to 2, life expectancy of more than 3 months, and normal renal, hepatic, and pulmonary function on study entry. Also, all patients had evidence of serum antibody against Ad5 adenovirus by Western blot analysis (data not shown).

After providing informed consent, patients underwent leukapheresis. Blood mononuclear cells were isolated via density gradient centrifugation and then infected for 24 hours with high-titer replication-defective Ad-CD154 in a Good Manufacturing Practice (GMP) facility, as described.²¹ Following infection, the cells were washed extensively to remove free virus and viably frozen in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) for storage in liquid nitrogen. An aliquot of cells was taken before freezing for bacterial culture to ensure sterility. On the day of treatment, the transduced cells were thawed and washed before intravenous infusion. The autologous transduced cells were administered as a single intravenous bolus infusion over approximately 10 minutes.

Mononuclear cell and T-cell isolation

Whole blood was collected from the patients into heparinized tubes and then spun at 100g for 10 minutes. The plasma was removed and then stored at -80°C . Mononuclear cells were isolated via Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation on Histopaque 1077 (Sigma Chemical, St Louis, MO). Following isolation, the cells were washed and suspended in RPMI-1640. Autologous T cells were isolated using anti-CD4 and anti-CD8-conjugated magnetic beads where indicated (Dynal, Lake Success, NY). For this, the mononuclear cells (1×10^6) were incubated with magnetic

beads (200 μL /each) for 1 hour at 4°C . The estimated number of Dynalbeads per T cell was 4 to 10. The magnetic bead-bound CD4⁺ and CD8⁺ cells were washed and eluted by DETACH-BEAD (100 μL) for 1 hour at room temperature. Over 95% of the isolated cells expressed CD3 as assessed by flow cytometry (data not shown).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from 5×10^6 blood mononuclear cells using RNeasy kit (Qiagen, Chatsworth, CA). First strand complementary DNA (cDNA) was synthesized using 5 μg of total RNA, the Superscript cDNA synthesis kit (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), and oligo-dT primers. The residual RNA was removed with RNaseH and one fourth of the cDNA was used in the polymerase chain reaction (PCR) reaction. The PCR reactions were performed for 30 cycles in 50 μL of $1 \times$ Boehringer Mannheim amplification buffer (Indianapolis, IN), Taq polymerase, and 200 $\mu\text{mol/L}$ of dNTP. Primers for the murine CD154 consisted of the sense primer 5'-GATGAGGATCCTCAAATTG-3' and the antisense primer 5'-GTT-TCTAGATCAGAGTTTGAGTAAGCC-3' (at 346-783); these amplified a 437-bp fragment of the 3' end of the CD154 molecule. One fifth of the amplified PCR product was visualized on a 1% agarose gel by ethidium bromide staining.

Enzyme-linked immunosorbent assay for plasma cytokines

We measured the levels of plasma cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We added antihuman IFN- γ , interleukin (IL)-6, IL-1 α , IL-4, or tumor necrosis factor (TNF)- α capture antibody (PharMingen, San Diego, CA) at 10 $\mu\text{g/mL}$ phosphate buffer (0.1 mol/L Na_2HPO_4 , pH 9.0) to individual wells of a 96-well EIA/RIA A/2 ELISA plate (Costar, Cambridge, MA). After an overnight incubation at 4°C , the plates were washed twice with wash buffer (0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline [PBS]). The wells then were filled with PBS containing 10% fetal calf serum (FCS) to block residual protein-binding activity. The plates were washed 4 times with wash buffer and incubated overnight with the patient plasma samples at 4°C . Recombinant human IFN- γ , IL-6, IL-1 α , IL-4, or TNF- α was used for standard curve (1:2 serial dilutions in detection buffer (10% FCS, 0.05% Tween 20 in PBS). The plates were washed 4 times in wash buffer and incubated for 1 hour at room temperature with biotinylated-mouse antihuman IFN- γ , IL-6, IL-1 α , IL-4, or TNF- α (PharMingen) 5 $\mu\text{g/mL}$ in detection buffer. The plates were washed twice and treated with Avidin and biotinylated horseradish peroxidase (Elite Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 hour at room temperature. IL-2 and IL-12 (p70) concentrations were determined using OptEIA ELISA kits (PharMingen, La Jolla, CA). After the plates were washed 5 times, the substrate TMB peroxidase was added (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). The OD at 450 nm was measured using an ELISA microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA) and cytokine concentrations were extrapolated from the standard curves.

Table 1. Patient characteristics and Ad-CD154-CLL dose

Patient	Age/gender	Rai stage/risk	Prior chemotherapy	Pre-treatment lymphocyte count*	Group	Viable cells administered
001	69/male	II/intermediate	No	82	Pilot	3.0×10^6
002	64/male	II/intermediate	Yes	310	Pilot	3.4×10^6
003	57/male	II/intermediate	No	81	1	3.8×10^6
004	68/female	II/intermediate	No	22	1	3.0×10^6
005	60/male	II/intermediate	Yes	22	1	3.2×10^6
006	75/male	II/intermediate	No	27	2	8.1×10^6
007	78/female	III/high	No	222	2	9.2×10^6
008	67/male	IV/high	Yes	357	2	7.9×10^6
009	68/male	II/intermediate	No	68	3	2.7×10^6
010	37/male	II/intermediate	Yes	301	3	3.0×10^6
011	71/male	IV/high	No	186	3	2.6×10^6

*Lymphocyte count $\times 10^{-9}/\text{mm}^3$ of blood prior to leukapheresis.

5A

ELISPOT assay

One hundred microliters of anti-IFN- γ antibody (clone no. 2G1, Endogen, Woburn, MA) at 10 μ g/mL in sterile PBS (pH 7.4) was added to each well of a 96-well nitrocellulose plate (Millipore, Bedford, MA). After an overnight incubation at 4°C, the plates were washed 4 times with sterile PBS. Residual protein-binding sites were blocked by adding 200 μ L/well of PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) or 10% FCS for a 30-minute or longer incubation at 37°C prior to adding cells. Serial dilutions of autologous T cells suspended in serum-free AIM-V media were added to separate wells of the microtiter plate (100 μ L/well). A fixed number (1×10^5 cells/well) of CD40-activated autologous CLL B stimulator cells was added to wells to give varying responder/stimulator ratios. The CD40-activated autologous CLL B cells were prepared from leukapheresis mononuclear cells by culturing the cells for 48 hours at 37°C either with HeLa cells transfected to express human CD154 or with their culture supernatant, which contained approximately 5 ng/mL soluble CD154, as assessed by ELISA. All assay media contained recombinant IL-2 at a final concentration of 25 U/mL. The murine anti-IL-2 mAb W6/32 was added to a final concentration of 10 μ g/mL to some of the wells, as indicated. The plates were incubated for 48 hours at 37°C in a 5% CO₂ incubator, washed free of cells 4 times with PBS, and then washed 4 times with PBS containing 0.05% Tween 20. One hundred microliters of biotinylated secondary anti-IFN- γ antibody (clone B133.5, Endogen) was added to each well at 1 μ g/mL in PBS containing 4% BSA. After 1 hour of incubation at 37°C, the wells were washed 4 times with PBS with 0.05% Tween 20. Then, 100 μ L of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Streptavidin at 1:500 concentration in PBS with 0.05% Tween 20 was added to each well. The plates were incubated for 30 minutes at room temperature. The wells then were washed 4 times with PBS containing 0.05% Tween 20. Fresh AEC substrate was prepared by dissolving one tablet of 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma) in 5 mL dimethylformamide and then diluting this into 45 mL of sodium acetate buffer, pH 5.0, that contains 25 μ L of freshly added 30% hydrogen peroxide. Then 100 μ L of AEC substrate was added to each well and the plates were incubated for 5 minutes or more at room temperature. The substrate solution was discarded and the plates were rinsed with tap water and air-dried. After the plates were completely dry, spots were counted for each well manually with a stereomicroscope.

Results

Infusion of Ad-CD154-transduced autologous CLL B cells

Eleven patients with progressive, intermediate or high-risk CLL by the modified Rai criteria were treated (Table 1). Patients received their autologous transduced cells an average of 44 ± 23 days after leukapheresis (range, 10-77 days). Five patients received approximately 3×10^8 (pilot group and group 1), 3 received approximately 1×10^9 (group 2), and 3 received approximately 3×10^9 (group 3) autologous Ad-CD154-transduced CLL cells according to a dose-escalation design (Table 1).

Fewer than 8% of the leukemia cells from the first 2 patients (pilot group) expressed detectable levels of the CD154 transgene, as assessed by direct monoclonal antibody (mAb) staining and flow cytometric analysis (Figure 1A). The 2 patients in the pilot group did not have a discernible clinical response to the infusion. On the other hand, approximately half ($49\% \pm 11\%$) of the CLL cells of patients in groups 1, 2, and 3 expressed the CD154 transgene, as assessed by flow cytometry (Figure 1A). Moreover, these cells had an average mean fluorescence intensity ratio (MFIR) of 4.8 ± 1.6 when stained with a fluorochrome-labeled anti-CD154 mAb versus a fluorochrome-labeled, isotype-matched control mAb of irrelevant specificity. As expected, the expression of the CD154 transgene by Ad-CD154-infected CLL B cells resulted in increased and/or *de novo* expression of immune accessory molecules, for example, CD54, CD95, CD80, and CD86 (data not shown).

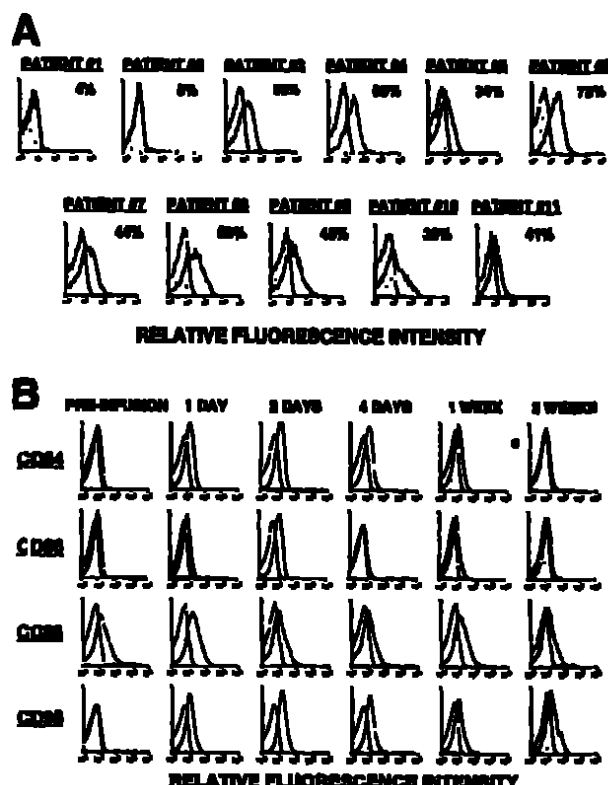


Figure 1. CD154 transgene expression by Ad-CD154-infected CLL B cells and *in vivo* modulation of costimulatory molecules on bystander leukemia cells following Ad-CD154-CLL infusion. (A) Following Ad-CD154 infection, blood mononuclear cells were stained with fluorochrome-labeled mAbs specific for CD19 and CD154 or an irrelevant specificity (isotype control). Cells were analyzed by multiparameter flow cytometry. The histograms depict the logarithmic fluorescence intensity of the gated CD19⁺ B-cell population stained with mAb against CD154 or an isotype control mAb. (B) Blood mononuclear cells were isolated from patients immediately before the infusion of autologous Ad-CD154-transduced CLL cells and on days 1, 2, 4, 7, and 14 thereafter. The cells were stained with fluorochrome-labeled mAbs specific for CD19 and another surface antigen, or an isotype control, as indicated. The histograms depict the staining of the gated CD19⁺ B-cell population with the respective mAb or an isotype control mAb.

Immunologic response to Ad-CD154-transduced CLL cells

Using reverse transcriptase (RT)-PCR, we detected expression of the CD154 transgene in the blood mononuclear cells of patients of groups 1 to 3 for at least 8 hours after the infusion of Ad-CD154-transduced leukemia cells (Figure 2). However, bystander leukemia cells that did not express the CD154 transgene had *de novo* or enhanced expression of CD80, CD86, CD54, and/or CD95 for several days after treatment (Figure 1B, Table 2, and data not shown). Such changes were not observed on the leukemia cells of patients in the pilot group, suggesting that a threshold number of infused Ad-CD154-transduced CLL B cells was required for this effect. Nevertheless, we did not otherwise discern a clear dose-response relationship between the number of infused Ad-CD154-transduced cells and the extent of the phenotypic changes on bystander cells of patients in groups 1, 2, and 3.

We examined whether there was a serum factor(s) induced by the infusion of Ad-CD154-CLL cells that could affect leukemia cell survival or expression of immune accessory molecules. For this, CLL cells obtained from patients before therapy were cultured for 24 hours in media supplemented with autologous serum collected before therapy and 8, 24, or 48 hours after the infusion of Ad-CD154-CLL cells. CLL cells cultured in media supplemented with 25% sera from any one of these time points had the same

55

58

56

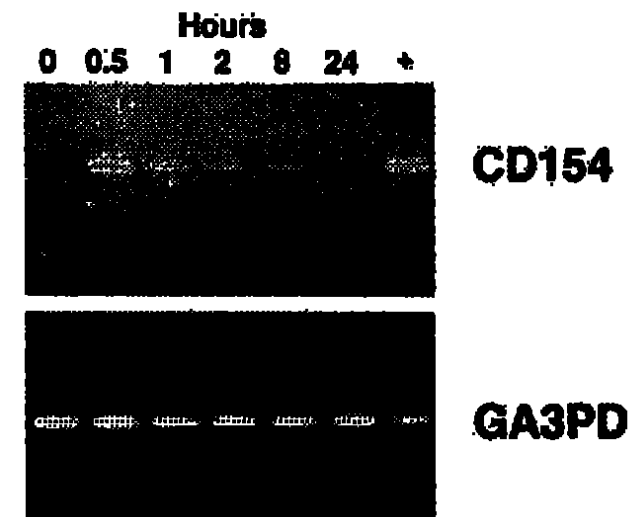


Figure 2. CD154 transgene expression in blood mononuclear cells isolated after infusion of autologous Ad-CD154-transduced CLL cells. To demonstrate CD154 transgene and the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PD) expression, RT-PCR was performed on messenger RNA (mRNA) isolated from blood mononuclear cells isolated from patient 003 prior to cell infusion and 0.5, 1, 2, 8, and 24 hours thereafter. The far right lane (+) represents RT-PCR performed with mRNA prepared from an aliquot of Ad-CD154-transduced cells used for infusion.

relative viability, as assessed by their ability to exclude propidium iodide (data not shown). Moreover, we did not observe any one of these sera to induce leukemia cells to increase their relative expression levels of CD80, CD86, or CD95 as assessed by flow cytometry (data not shown).

High levels of Th1-type cytokines were detected in the plasma from patients in groups 1 to 3 after infusion of Ad-CD154-CLL cells. Two of the 3 patients in group 1 and all patients of groups 2 and 3 had high plasma concentrations of IL-12 and IFN- γ 8 to 48 hours after the infusion of Ad-CD154-transduced cells (Table 3). Peak IL-12 levels correlated with peak IFN- γ levels by nonparametric analysis (Spearman $r = 0.7782$, 2-tailed $P = .017$). However, the IL-12 levels were noted to rise more rapidly and to peak earlier than that of the plasma levels of IFN- γ (Table 3). In contrast, 10^5 CD19 $^+$ Ad-CD154-infected CLL B cells produced less than 0.2 pg of IL-12 and less than 0.2 ng of IFN- γ in 48 hours in vitro, suggesting that the Ad-CD154-transfected leukemia B cells were not the source of the plasma Th1 cytokines detected in vivo (data not shown).

Table 2. Systemic CD19 $^+$ leukemia B cells increase expression of CD86 following treatment

Patient	Mean fluorescence intensity ratio*	
	Preinfusion	Postinfusion
003	1.5	3.8
004	1.3	3.5
005	1.6	1.9
006	1.0	1.8
007	1.0	2.8
008	1.1	2.3
009	1.1	2.8
010	1.1	1.7
011	1.3	1.9

*Patient blood was obtained prior to (preinfusion) and on the second day following (postinfusion) treatment with autologous Ad-CD154-CLL cells. Mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density centrifugation then stained with fluorochrome-labeled mAb against CD19 and CD86 and analyzed by multicolor flow cytometry. Mean fluorescence intensity ratio is the ratio of mean fluorescence intensity of CD19 $^+$ cells stained with anti-CD86 mAb divided by mean fluorescence intensity of CD19 $^+$ cells incubated with isotype control mAb of irrelevant specificity.

Table 3. Cytokine responses following treatment

Patient	Peak plasma cytokine level (p)*		
	IL-12 pg/mL	IFN- γ ng/mL	IL-6 pg/mL
003	37 (8)	2100 (24)	115 (24)
004	< 10 (nd)	60 (24)	< 40 (nd)
005	< 10 (nd)	< 4 (nd)	< 40 (nd)
006	13 (4)	271 (24)	81 (24)
007	177 (4)	880 (24)	80 (24)
008	108 (8)	333 (24)	121 (24)
009	135 (24)	8000 (48)	7557 (8)
010	34 (8)	490 (24)	< 40 (nd)
011	230 (8)	698 (24)	884 (24)

*Patient plasma was evaluated for IL-12, IFN- γ , and IL-6 by sandwich ELISA at 2, 4, 8, 24, 48, 72, and 180 hours following infusion of autologous Ad-CD154-CLL cells. Preinfusion (0 h) baseline levels of all cytokines were below the level of detection. Peak cytokine concentrations are expressed as the mean of triplicate determinations and estimated from a standard curve.

We also observed increases in absolute numbers of blood T cells following the infusion of Ad-CD154-transduced cells. Such increases followed the rise in cytokine levels by several days and lasted several weeks. All 3 patients in group 1 had substantial increases (206%-482%) in the absolute numbers of blood T cells by 1 to 4 weeks after the infusion of Ad-CD154-transduced CLL cells (Table 4). Two of the 3 patients in group 2 had significant increases

Table 4. Increased blood absolute T-cell counts following treatment

Patient		Absolute T-cell count (/ μ L)*		% Increase	Week
		Day 0	Peak		
003	CD3 $^+$	1780	5440	208	1
	CD4 $^+$	880	1250	84	
	CD8 $^+$	770	3810	398	
004	CD3 $^+$	220	1280	482	3
	CD4 $^+$	80	800	900	
	CD8 $^+$	140	880	500	
005	CD3 $^+$	180	830	231	4
	CD4 $^+$	40	300	400	
	CD8 $^+$	120	240	100	
006	CD3 $^+$	810	4430	388	1
	CD4 $^+$	300	580	87	
	CD8 $^+$	520	3410	558	
007	CD3 $^+$	2240	4880	168	3
	CD4 $^+$	1120	3340	188	
	CD8 $^+$	1000	1220	22	
008	CD3 $^+$	3710	4880	38	1
	CD4 $^+$	480	2290	358	
	CD8 $^+$	830	2040	118	
009	CD3 $^+$	1680	5830	412	1
	CD4 $^+$	300	550	83	
	CD8 $^+$	380	4430	1168	
010	CD3 $^+$	1740	5500	218	4
	CD4 $^+$	530	1870	221	
	CD8 $^+$	1040	3110	198	
011	CD3 $^+$	2850	5810	87	2
	CD4 $^+$	1580	2010	27	
	CD8 $^+$	1580	3010	81	

*Blood was collected from patients preinfusion (day 0), 1, 2, 3, 4, 8, and 12 weeks following treatment with Ad-CD154-CLL cells. A complete blood count with manual differential was performed and mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density centrifugation. Mononuclear cells were stained with fluorochrome-labeled mouse anti-human CD3, CD4, and CD8 monoclonal antibody and isotype control then analyzed by flow cytometry to obtain percent CD3 $^+$, CD4 $^+$, and CD8 $^+$ cells. Absolute T-cell counts were calculated by multiplying absolute mononuclear cell count times percent CD3 $^+$, CD4 $^+$, or CD8 $^+$ cells. The peak time and absolute T-cell count are depicted.

26

(109% and 386%) in the numbers of T cells 1 to 3 weeks after treatment (Table 4). Finally, all 3 patients in group 3 had significant increases (97%-412%) in the absolute numbers of blood T cells within 1 to 4 weeks after the infusion of Ad-CD154-transduced cells (Table 4). We observed increases in the absolute numbers of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, commonly resulting in absolute T-cell numbers of more than 4000 to 5000/ μ L of blood after therapy (Table 4).

We used an ELISPOT assay to examine whether the increases in absolute T-cell counts after treatment were associated with expansions in the numbers of T cells that were reactive against autologous CLL B cells. Blood T cells from patients before therapy and 4 weeks after treatment were cultured for 48 hours with CD40-activated autologous CLL B cells. The proportions of T cells induced to make IFN- γ in response to autologous CD40-activated CLL B cells increased after treatment. This response could be partially inhibited by W6/32, a mouse mAb specific for a nonpolymorphic determinant found on all HLA class I molecules, but not by a control mouse mAb of irrelevant specificity (Figure 3 and data not shown). Similar reproducible findings were observed in all patients tested ($n = 3$, data not shown).

Patients' blood T cells collected several weeks after treatment also had increased reactivity against autologous CLL B cells relative to that of blood T cells collected before therapy. T cells were collected 6 months after treatment with Ad-CD154-CLL and examined for their ability to mount MLRs against autologous CLL B cells. Such T cells produced significantly greater amounts of IFN- γ in response to autologous CLL B cells than equal numbers of T cells collected before treatment (Figure 4A). Furthermore, these T cells collected after treatment incorporated significantly higher levels of ³H-thymidine in the MLR with autologous CLL cells than T cells collected before treatment (Figure 4B). Both T-cell production of IFN- γ and proliferation were dependent on the presence of CLL stimulator cells and could be partially inhibited by the anti-HLA class I mAb, W6/32, but not by MOPC21, an isotype control mAb of irrelevant specificity.

Clinical responses to Ad-CD154-transduced CLL cells

Because 97% or more of the blood lymphocytes of the patients in this study were CLL B cells (Tables 1 and 4), we monitored the

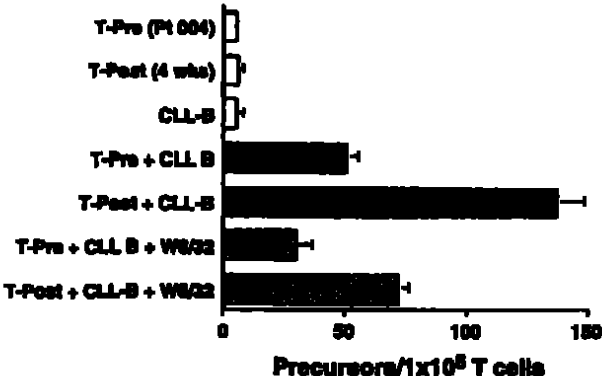


Figure 3. Ex vivo T-cell production of IFN- γ in response to autologous CLL cells before and after infusion of Ad-CD154-transduced CLL cells. The data from 1 of 3 representative experiments on each of 3 different patients are presented. Blood mononuclear cells were isolated from patient 004 prior to (T-Pre) and 4 weeks after infusion of Ad-CD154-transduced CLL cells (T-Post). T cells were isolated from the blood mononuclear cells using CD4- and CD8-specific Dynabeads. A 48-hour ELISPOT for IFN- γ -producing T cells was performed at a responder:stimulator ratio of 1:1. The mean number of spots per duplicate wells is expressed as the T-cell precursor frequency per 1×10^5 T cells. The error bars indicate the SD about the mean.

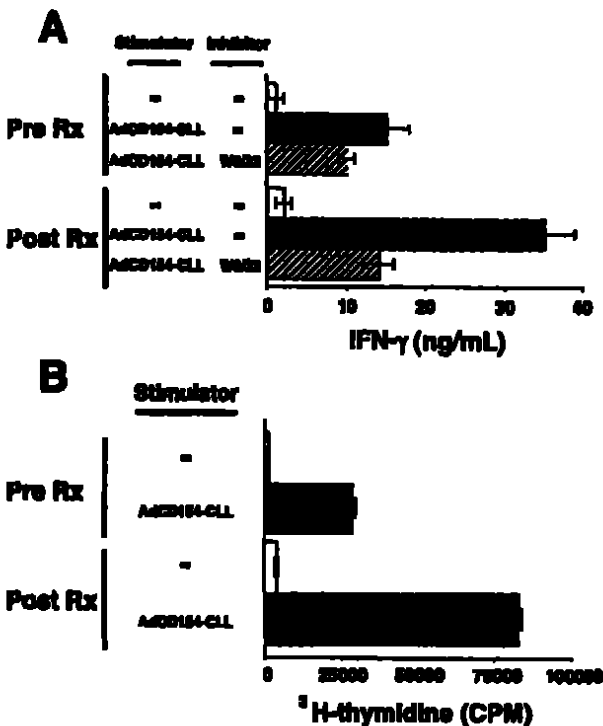


Figure 4. Activation and proliferation of T cells by autologous CLL cells before and after infusion of Ad-CD154-transduced CLL cells. T cells were isolated from the blood mononuclear cells collected from patient 003 prior to (Pre Rx) and 6 months after infusion of Ad-CD154-transduced CLL cells (Post Rx). Autologous CLL B cells were infected with Ad-CD154 for 24 hours at a multiplicity of infection of 300. Transduced cells were treated with mitomycin C (80 μ g/mL) for 1 hour and then washed prior to using them as stimulator cells (Ad-CD154-CLL) for autologous MLRs with the isolated T cells. (A) Patient T cells (1×10^5 cells/well) with or without autologous stimulator cells (Ad-CD154-CLL) (5×10^5 cells/well) were added to wells of a 96-well plate in serum-free AIM-V medium containing recombinant IL-2 at 25 U/mL. The murine anti-HLA mAb W6/32 was added to a final concentration of 10 μ g/mL to some wells, as indicated. Plates were incubated for 4 days at 37°C prior to harvesting the supernatants. IFN- γ concentration in the supernatants was determined by standard capture ELISA. The graph depicts the mean IFN- γ concentration of triplicate wells. The error bars indicate the SD about the mean. (B) Patient T cells (1×10^5 cells/well) with or without autologous stimulator cells (Ad-CD154-CLL) (5×10^5 cells/well) were added to wells of a 96-well plate as described in panel A. The plates were incubated for 64 hours at 37°C prior to adding ³H-thymidine to each well at 1 μ Ci per well. The cells were harvested 12 hours later and the incorporated ³H-thymidine assessed by scintillation counting. The mean cpm values of triplicate wells are indicated $\pm$ SD.

absolute blood lymphocyte counts to follow the clinical response to treatment. Pilot study patients 001 and 002, who received autologous CLL cells of which only 4% or 8% expressed the CD154 transgene (Figure 2), did not have significant, sustained reductions in blood lymphocyte counts (Figure 5A). Although pilot group patient 002 did have a 30% or less reduction in blood lymphocyte count from pretreatment values, this was not sustained beyond 3 weeks after treatment. Moreover, 3 weeks after treatment, the blood lymphocyte counts of both patients in the pilot group persistently increased at rates similar to those observed before therapy (Figure 5A and data not shown), indicating that these patients continued to have progressive disease.

In contrast, the patients of groups 1 to 3 had significant reductions in blood lymphocyte counts (Figure 5A). The blood lymphocyte counts of 2 of the 3 patients in group 1 decreased by 68% and 87%, from pretreatment values within 48 hours of infusion (Figure 5A). Moreover, these 2 patients had sustained reductions in lymphocyte counts of 66% and 65% within 2 to 4 weeks after treatment (Figure 5A). Similarly, all patients in group 2 experienced reductions in blood lymphocyte counts of more than 30%

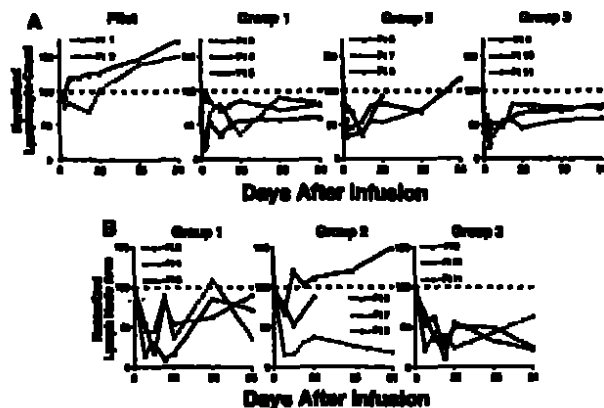


Figure 5. Reductions in absolute lymphocyte count and lymph node size following an infusion of autologous Ad-CD154-transduced CLL cells. (A) Complete blood count and manual differential were performed at the indicated time points from the day of infusion of Ad-CD154 CLL cells (day 0). Absolute lymphocyte counts were calculated and then normalized with respect to the lymphocyte count obtained before leukapheresis. (B) Lymph node area was assessed by nodal palpation in 2 dimensions in right and left cervical, supraclavicular, and axillary regions. The largest lymph node in each of the right and left nodal regions palpated on the day-of-cell infusion was selected and followed over time. The total lymph node bulk was represented as the sum area of the largest lymph node in each of the right and left nodal regions. The normalized lymph node area represents the sum lymph node area at a particular time as a fraction of sum area on day 0 (day 0) times 100.

within 3 days and 54% to 66% within 1 to 2 weeks after receiving the infusion of transduced cells (Figure 5A). Furthermore, all patients in group 3 had reductions in blood lymphocyte counts of 66% to 83% within 2 to 3 days and sustained reductions of 49% to 55% within 2 to 4 weeks after the infusion of transduced cells. All patients of groups 1 and 3 had blood lymphocyte counts after therapy that were below that of pretreatment values. Moreover, in contrast to the patients in the pilot group, the patients in groups 1 to 3 did not show continued progressive increases in their blood lymphocyte counts for 3 months or more after treatment (Figure 5A and data not shown). The patients of groups 1 to 3 also experienced reductions in lymph node size 1 to 4 weeks after receiving a single infusion of autologous Ad-CD154-CLL cells (Figure 5B). All 3 patients in group 1 experienced a 64% to 90% reduction in lymph node size 2 to 4 weeks after therapy. Furthermore, all patients in group 2 experienced a 33% to 85% reduction, and all 3 patients in group 3 experienced 75% to 78% reductions in lymph node size within 1 to 4 weeks following therapy. In most cases, the reductions in lymph node size were sustained for 3 months or more after treatment (Figure 5B and data not shown).

Safety

The treatment was well tolerated with no immediate adverse reactions associated with infusion of Ad-CD154-transduced cells. The 2 patients in the pilot group did not have a discernible clinical response to the infusion. Patients in groups 1 to 3, however, generally developed flu-like symptoms (eg, fever, fatigue, arthralgia, myalgia, nausea, and anorexia) by 12 hours after the infusion. Less common adverse reactions included headache, edema, dehydration, and diarrhea (data not shown). After treatment, a few patients developed mild, transient elevations in serum transaminase levels. Some patients had prolongation of prothrombin time, hypoalbuminemia, and/or a 40% or less reduction in platelet counts after treatment (data not shown).

The coagulation abnormalities were not due to disseminated intravascular coagulation, in that no patients developed microangio-

pathic changes in their circulating red cells or had elevations in the plasma levels of fibrin-split products (data not shown). Rather, the prolongation in prothrombin time could be corrected by a 1:1 mix with control plasma and correlated with an acute, transient reduction in the level of factor VII (data not shown). Moreover, the decreases in platelet counts did not correlate with the administered dose and were transient, lasting less than 1 week.

Both clinical and laboratory abnormalities were transient, were not dose limiting, and resolved within a few days after treatment. None of the treated patients developed immune thrombocytopenia, autoimmune hemolytic anemia, or a positive direct antiglobulin test. We did not identify a dose-limiting toxicity or a maximum tolerated dose in this study.

Discussion

Hematologic malignancies are good candidate diseases for gene therapy in that large quantities of viable neoplastic cells can be readily harvested as single-cell suspensions for gene transfer *ex vivo*. Optimal methods for gene transfer and direct measurement of transgene expression can be achieved *in vitro*, allowing for controlled dose-escalation studies in which increasing numbers of transduced, autologous cells can be delivered back to the patient. Nevertheless, to date there have not been any published reports on clinical trials examining the use of gene transfer for the treatment of such diseases.

We developed an immune gene therapy protocol for patients with CLL based on *in vitro* studies demonstrating that CLL cells transduced with Ad-CD154 became highly proficient at antigen presentation and could induce autologous T-cell responses leading to the generation of CLL-specific CTL.¹⁸ In these *in vitro* studies, CLL cells transduced with an adenovirus vector encoding an irrelevant protein (β -galactosidase) were unable to induce autologous T cells, or even allogeneic T cells, to proliferate or to secrete cytokines in an MLR. We reasoned that autologous CLL cells transduced with Ad-CD154, but not with a control adenovirus vector, could induce host antileukemic immune responses *in vivo*. This formed the basis for the immune gene therapy protocol described in this report.

Following infusion of autologous Ad-CD154-transduced cells, we observed phenotypic changes on bystander leukemia cells *in vivo* (Figure 1B and Table 2). This effect could not be mimicked by culturing the CLL cells in autologous sera obtained at various times after treatment, but rather resembled the bystander effect observed with Ad-CD154-transduced CLL cells on noninfected CLL B cells *in vitro*.¹⁸ This is despite the fact that the number of resident nontransduced leukemia greatly outnumbered the infused Ad-CD154-CLL B cells by estimated ratios of over 10 000:1. Such phenotypic changes were not restricted to only a subset of leukemia cells but were observed for the entire leukemia cell population. Because cytokines apparently could not effect such phenotypic changes *in vitro*, it is plausible that bystander leukemia cells are induced to express these surface antigens in secondary lymphoid compartments where there is a greater chance for cognate intercellular interactions to occur. If so, then the induced expression on the bystander leukemia cells seen in this study argues for a dynamic recirculation of leukemia cells between the blood and tissue compartments after treatment.

We also noted high plasma levels of Th1-type cytokines soon after the infusion of Ad-CD154-CLL cells. Indeed, significant

58

6x

levels of IL-12 and IFN- γ were detected in the plasma within hours following cell infusion, peaking at 4 to 8 hours or 24 to 48 hours, respectively (Table 3). It is unlikely that these cytokines were made by the infused cells. IL-12 ordinarily is produced by activated T cells, mononuclear phagocytic cells, and dendritic cells (as reviewed in Gately et al²²), but not by Ad-CD154-CLL B cells cultured in vitro (data not shown). Furthermore, we did not observe a dose-response relationship between peak cytokine levels and the relative number of infused Ad-CD154-transduced cells. As such, the cytokines detected in treated patients most likely reflected a host response to the infusion of the Ad-CD154-transduced cells. Of these, IL-12 is a key cytokine in the Th1-response to antigen.²² Biologic effects of IL-12 include enhanced cytotoxic lymphocyte activity in CD8⁺ T cells and natural killer cells, induction of IFN- γ production by CD4⁺ Th1 cells, and further differentiation of antigen activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells.²²

In addition, we also noted expansion of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the blood of patients 1 to 3 weeks after therapy. ELISPOT and autologous MLR studies indicated that the infusion of Ad-CD154-CLL cells enhanced the numbers of T cells that produce IFN- γ in response to autologous CLL cells in vitro. These in vitro studies used CD40-activated CLL stimulator cells that were not infected with adenovirus, indicating such increased responses were not against adenovirus-associated antigens. Moreover, we noted W6/32, but not an isotype control mAb, could partially inhibit such responses in vitro (Figures 3 and 4). This mAb recognizes nonpolymorphic determinants of HLA class I antigens and can interfere with the ability of human MHC class I molecules to present peptide antigens. As such, infusion of Ad-CD154-CLL cells apparently increases the number of T cells that can respond to MHC class I-restricted, leukemia-associated antigens.

The acute decreases in leukemia cell counts within 48 hours were unexpected. One possible explanation for the acute fall in circulating leukemia cell numbers includes leukemia cell homing or margination. However, none of the treated patients experienced a decrease in absolute lymphocyte count with signs of tissue infiltration or increases in lymph node size or vice versa. Instead, durable decreases in absolute leukemia cell counts were associated with reductions in lymph node size (Figure 5). As such, the infusion of autologous Ad-CD154 cells apparently resulted in an overall reduction in total tumor burden, even in patients with high leukemia cell counts and advanced disease. We reason that the acute decreases in leukemia cell counts most likely are due to leukemia cell apoptosis, possibly secondary to either alterations in leukemia microenvironment and/or the activity of an innate immune response to the infused cells. In any case, the initial rapid kinetics of the fall in leukemia cell counts indicates that this effect is not mediated by a *primary* leukemia-specific T-cell response.

However, it is still possible that the rapid kinetics of leukemia cell clearance is secondary to the effects of a "recall" secondary immune response to the modified leukemia cells. Both the ELISPOT data (Figure 3) and the MLR data (Figure 4) indicate that there are leukemia-reactive T cells present in patients with this disease even before the infusion of the Ad-CD154-transduced cells. Moreover, the ability to induce leukemia-specific CTL after a few days in vitro is consistent with the notion that patients already are primed for a CTL response against target cells that express leukemia-associated antigens.¹⁸ This implies that activation of such a recall immune

response can occur within the time period when the early reductions in leukemia cell counts are observed, thereby potentially contributing to leukemia cell clearance noted within the first few days after treatment. However, further studies are required to test this hypothesis.

Although there did not appear to be clear dose-response relationships between the patients of groups 1 to 3, there may be a threshold below which there is no discernible immunologic or clinical activity. Even though patients in group 1 received 10-fold fewer cells than those in group 3, patients in both groups had sustained reductions in blood lymphocyte counts and did not show signs of disease progression after therapy. On the other hand, the patients in the pilot group, who received cells expressing low levels of the CD154 transgene, did not experience a significant decline in blood lymphocyte counts or change in the disease progression after treatment. Furthermore, the peak plasma levels of cytokines, such as IL-12 or IFN- γ , did not correlate with the dose of administered cells. Instead, nonparametric analysis revealed a relationship between the peak plasma cytokine levels and the absolute total T-cell counts at the time of treatment. This relationship correlated more significantly with absolute CD4⁺ T-cell counts than with absolute CD8⁺ T-cell counts. As such, the blood levels of CD4⁺ T cells at the time of therapy may have a significant impact on subsequent immunologic and clinical responses. Therefore, the magnitude of the biologic activity may depend more on a patient's immune status at the time of treatment than on the relative number of infused cells, provided that a certain threshold dose is achieved. Accordingly, this form of treatment may have an even greater effect on patients who have a fully functional immune system and/or early onset or minimal residual disease.

Patients with CLL are at high risk for spontaneously developing autoimmune hemolytic anemia or immune thrombocytopenic purpura.²³⁻²⁵ One model proposes that aberrant expression of CD154 may be responsible for such autoimmunity in patients with CLL.²⁶ An alternative model proposes that such autoimmunity may reflect immune dysregulation caused by an acquired deficiency of CD154 activity.²⁷ In this regard, it is noteworthy that patients with congenital lack of CD154 also are at increased risk for developing autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenic purpura despite having a profound immune deficiency.²⁸ In any case, none of the treated patients developed any signs of such autoimmunity despite receiving relatively large numbers of cells expressing CD154.

Actually, the infusion of autologous Ad-CD154-CLL cells expressing high levels of the CD154 transgene was well tolerated. Some patients experienced laboratory abnormalities, such as elevation in hepatic transaminase levels, reduction in platelet counts, or prolongation of prothrombin times. These abnormalities were grade 2 or less in magnitude and of limited duration. The clinical adverse reactions primarily consisted of flu-like symptoms that developed 6 to 8 hours after infusion and lasted a few days. These clinical adverse reactions most likely were secondary to the release of endogenous cytokines, such as IFN- γ and IL-12. These cytokines can induce flu-like symptoms and some of the observed laboratory toxicities when administered to patients.²⁹

Because significant increases in T-cell numbers were observed following a single dose of Ad-CD154-transduced cells, a greater and more durable response is hypothesized to occur with repeat dosing. As discussed, pretreatment T-cell counts may have an impact on the initial response to treatment. Even patient

59

62

005, who had been pretreated with multiple cycles of chemotherapy and had very low pretreatment T-cell numbers, experienced an increase in the absolute numbers of CD4⁺ T cells after treatment (Table 4). Conceivably, subsequent infusions of autologous Ad-CD154-CLL cells when the T-cell counts are

increased could induce more significant immunologic and clinical effects. As such, dosing schedule, rather than amount of cells per dose, may prove to be the critical factor for developing this into an effective and potentially curative gene therapy strategy for patients with CLL.

References

- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*. 1999;49:8-31.
- Kippes TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Boffa E, Lichtman MA, Celler BS, Kippes TJ, eds. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1996:1017-1038.
- Caligiuri-Cappio P. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood*. 1998;97:2618-2620.
- Roswald LJ, Kippes TJ. Lack of allele exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1997;185:1435-1445.
- Johnson TA, Roswald LJ, Kippes TJ. Ig VH1 genes expressed in B-cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol*. 1997;158:235-248.
- Fals F, Ghisla F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102:1516-1525.
- Koduru PR, Lichtman SM, Smilari TF, et al. Serial phenotypic, cytogenetic and molecular genetic studies in Richter's syndrome: demonstration of lymphoma development from the chronic lymphocytic leukemia cells. *Br J Haematol*. 1993;92:613-618.
- Finn WG, Thangavelu M, Yelavarthi KK, et al. Karyotype correlates with peripheral blood morphology and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1998;105:458-467.
- Ranheim EA, Kippes TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemia B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*. 1993;177:928-935.
- Yellin MJ, Shering J, Covey LR, et al. T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity. *J Immunol*. 1994;153:855-874.
- Ranheim EA, Cantwell MJ, Kippes TJ. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1998;92:3559-3568.
- Ranheim EA, Kippes TJ. Turner nasens factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD84 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L. *Cell Immunol*. 1998;191:228-235.
- Van den Hove LE, Van Geel BW, Vandenberghe P, et al. CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia*. 1997;11:572-580.
- Schulze J, Nodder LM, Grisham JB. B²²-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev*. 1998;10:111-127.
- Lanachow DJ, Watkins TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1998;14:233-258.
- Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchera VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol*. 1998;18:389-418.
- van Kesteron C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol*. 1998;61:1-77.
- Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kippes TJ. Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 1998;101:1133-1141.
- Dilke D, Brown M, Restrow M, et al. CD40 ligand induces an antileukemia immune response in vivo. *Blood*. 1997;90:1827-1833.
- French RR, Chen HT, Tuss AL, Glavinia MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med*. 1998;4:848-853.
- Cantwell MJ, Sharma S, Friedmann T, Kippes TJ. Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1998;92:4678-4683.
- Getatsy MK, Ruzsanti LM, Magram J, et al. The Interleukin-12/Interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:489-521.
- Damaschek W. Chronic lymphocytic leukemia—an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*. 1997;90:886-894.
- Hornblin TJ, Oester DG, Young SJ. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Pathol*. 1988;38:713-718.
- Dutreen U, Augener W, Ziegler T, Brötting G. Spectrum and frequency of autoimmune derangements in lymphoproliferative disorders: analysis of 637 cases and comparison with myeloproliferative diseases. *Br J Haematol*. 1997;97:225-238.
- Caligiuri-Cappio P, Hornblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 1998;17:399-408.
- Cantwell MJ, Han T, Pappas J, Kippes TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;3:884-888.
- Rosen FB. Autoimmunity and immunodeficiency disease. *Ciba Found Symp*. 1997;192:135-148.
- Mari S, Pao WJ. Single institution experience with recombinant gamma-interferon in the treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1995;19:149-153.

To the editor:

Interleukin-15 as a potential costimulatory cytokine in CD154 gene therapy of chronic lymphocytic leukemia

In their work recently published in *Blood*, Wiarda and coworkers¹ demonstrated that adenovirus-mediated gene transfer of CD154 into chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells and the retransfer of these cells into the bloodstream of CLL patients resulted in increased or de novo expression of immune accessory molecules, such as CD54, CD95, CD80, and CD86, on CLL bystander cells and restored the capacity of CLL cells to stimulate autologous T cells. As a result, rising plasma levels of Th1-type cytokines and increased absolute numbers of blood T cells were observed, as well as a T-cell subset reactive against autologous CLL cells. These findings correlated with a clinical response manifested as a reduction in absolute lymphocyte count and lymph node size.

The idea behind a CD154 gene therapy protocol was based on an earlier study in which an impaired intrinsic CD40 activation of CLL cells was observed and contributed to a suppression of CD154 expression on T cells by B-CLL cells.² In the present study, we found significantly lower basal CD40 expression levels in CLL compared to B cells from age- and sex-matched healthy donors (mean specific fluorescence intensity [MFI] CLL (n = 41): mean $\pm$ SEM $2.7 \pm .22$ vs healthy controls (n = 41): $4.6 \pm .26$, $P < .0001$). Besides lower expression levels, the CD40-mediated signal transduction was impaired, as an up-regulation of CD95 expression following CD40 activation could be observed only in normal but not in CLL B-cells (Figure 1). From our results, we conclude that not only aberrant regulation of CD154, but also deficiencies in CD40 expression and/or signal transduction might contribute to the impaired T-cell activation in CLL. In an attempt to increase CD40 expression and signaling in CLL cells, we tested the effect of interleukin-15 (IL-15), a known T- and natural killer (NK)-cell activator. Although in vitro experiments suggested an increase in

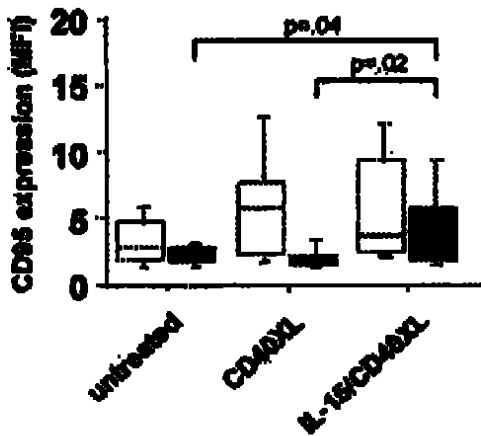


Figure 1. PBMC of 26 CLL patients (gray squares) and of 24 healthy donors (white squares) were left untreated or stimulated with IL-15 (80 ng/mL, 7 days) or activated via CD40 cross-linking (CD40XL, ie, treated with 1 μ g/mL anti-human CD40 mAb followed by a 5-day incubation with an antihuman mAb). The expression of CD95 was determined by staining of cells with a specific FITC-labeled antihuman CD95 mAb or a relevant isotype-specific control.

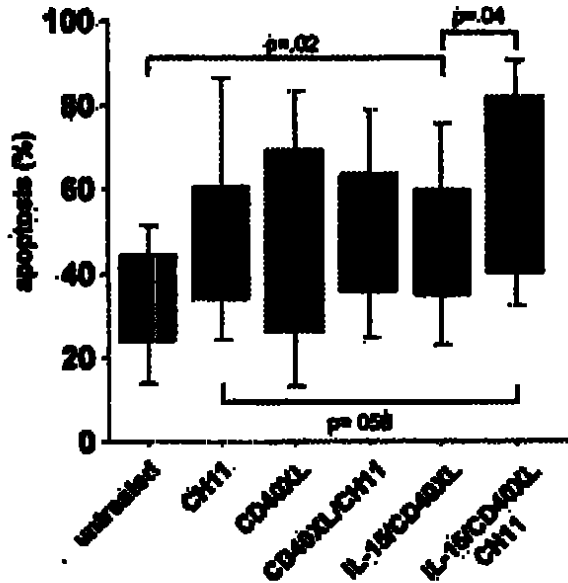


Figure 2. PBMCs of 10 CLL patients were left untreated or stimulated with IL-15 (7 days), activated via CD40XL (3 days), or stimulated with an anti-CD95 mAb (CH11, 250 ng/mL, 3 days). Apoptosis was measured by using an annexin VPI assay. All statistics were done using ANOVA tests.

[³H]-thymidine uptake in CLL cells triggered by IL-15,³ such a tumor-promoting effect might be counteracted by the induction of a successful T-cell response. In fact, this cytokine has been shown to up-regulate costimulatory molecules in hematopoietic cell lines.⁴ Our results demonstrated that stimulation of B-CLL cells by IL-15 enhances CD40 expression significantly (MFI untreated: $3.9 \pm .19$ vs IL-15-treated: $5.4 \pm .38$, $P < .002$, n = 14), accompanied by a reconstitution of CD40 signaling capacity, as shown by the up-regulation of CD95 following costimulation of CLL cells with IL-15 and also by CD40 cross-linking (IL-15/CD40XL) (Figure 1). Wiarda et al demonstrated that CD154-mediated CD40 activation led to the stimulation of T cells reactive against CLL cells.¹ We observed that IL-15 was a prerequisite for the induction of apoptosis in CLL cells via the CD40 pathway (Figure 2). It has been shown that the killing of target cells by cytotoxic T cells is mediated, at least in part, via the activation of CD95.⁵ Since we observed the up-regulation of CD95 on CLL cells activated by IL-15 and CD40, we tested whether this increases the sensitivity of CLL cells toward CD95 ligation following the addition of an agonistic anti-CD95 antibody (CH11, 250 ng/mL, for 3 days). As also observed for spontaneous apoptosis, CD40 activation following IL-15 prestimulation resulted in an increased number of apoptotic CLL cells (Figure 2). From these data it can be concluded that the combination of IL-15 and CD40 stimulation renders B-CLL cells more sensitive to FasL⁺ cells, which are either cytotoxic T cells or themselves B-CLL cells.⁶

In conclusion, we wonder whether autologous IL-15 contributes to some of the immunological effects observed during treatment with adenovirus CD154-modified B-CLL cells and suggest that the cytokine might qualify as an adjuvant augmenting the therapeutic efficacy by rendering B-CLL cells more susceptible to killing by tumor-specific T cells.

Gabriele Anthes, Ingrid Marschke, Ingo Tinkhoff, and Richard Grell

Correspondence: Richard Grell, Laboratory of Molecular Cytology, Internal Medicine, and Tyrolean Cancer Research Institute, University of Innsbruck, Austria.

Supported by Oesterreichische Nationalbank, grant no. 8222 (R.G., G.A.); Austrian Science Foundation, grant no. T08-P01 (I.T.); and Tyrolean Cancer Aid (R.G., I.M.).

References

- Wardle WJ, Cantwell MJ, Woods GJ, Rowland LJ, Frensch CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD134) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000;95:3917-3924.
- Cantwell M, Hua T, Pappas I, Kipps TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;3:884-888.
- Trentin L, Caruso A, Zambello R, et al. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1998;91:3337-3338.
- Zhang Z, Tishchinski M, Auld S, et al. Expression patterns of constitutively molonized on cells derived from human hematological malignancies. *J Exp Clin Cancer Res*. 1998;17:351-358.
- Hahn S, Gabel R, Iltis R. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev*. 1995;142:67-79.
- Tinkhoff I, Marschke I, Kun M, et al. Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1998;91:4373-4381.

To the editor:

Reconsidering anticoagulant therapy in venous thromboembolism

Blood readers should be aware of the omission of crucial information in a meta-analysis by Michael B. Streiff, which stated, "Although anticoagulation remains the primary therapy for venous thromboembolism, vena caval filters are an important alternative when anticoagulants are contraindicated."^{1(p449)} Dr Streiff and the researchers in the articles that he referenced did not mention or discuss a randomized controlled trial by Nielsen et al, comparing heparin and a phenprocoumon anticoagulation with phenylbutazone in patients with deep venous thrombosis (DVT).^{2,3} This is the only published randomized controlled trial of treatment of DVT patients with unanticoagulated controls, as opposed to standard anticoagulation controls. It was a negative study with 1 of 48 anticoagulated patients dying of pulmonary embolisms (PEs) and 0 of 42 phenylbutazone patients with fatal PEs.

Heparin and vitamin K antagonists became standard treatment for DVT and PE patients in the 1940s before the advent of randomized controlled trials to prove efficacy. The FDA allowed them to be "grandfathered in" as standard treatment of DVT and PE in the early 1960s when proof of efficacy became required for FDA approval. Low-molecular-weight heparins (LMWH) have been granted indications for treatment of DVT and PE by virtue of randomized controlled trials showing equivalence with heparin in trials that do not include unanticoagulated controls.

I am not suggesting that Dr Streiff intentionally neglected to cite this crucial study. None of the other major reviews of the treatment of venous thromboembolism (VTE) and none of the published trials of LMWH in VTE treatment mention the Nielsen study. Last

year, I spoke with Lilia Talarico, chief of the Coagulation and GI Drug section of the FDA's Center for Drug Evaluation and Research (CDER), who did not know then of the Nielsen study. But based on this important trial and an overall review of the data, Janet Woodcock, chief of CDER; Robert Temple, director of FDA's Office of Medical Policy; and Dr Talarico are considering the withdrawal of the indication for anticoagulants (heparin, LMWH, and vitamin K antagonists) in prophylaxis and treatment of VTE.

For the articles and FDA correspondence detailing the case for withdrawing the indications for anticoagulants (heparin, LMWHs, and vitamin K antagonists) in prophylaxis and treatment of VTE, please see Cundiff.⁴

David K. Cundiff

Correspondence: 318 Grand Ave, Long Beach, CA 90814

References

- Streiff MB. Vena caval filters: a comprehensive review. *Blood*. 2000;95:3909-3977.
- Nielsen HK, Husted SE, Krusell LR, Posing H, Charles P, Hansen HH. Does pulmonary embolism in patients with deep venous thrombotic incidence and rate in a randomized, controlled trial of anticoagulation versus no anticoagulation. *J Intern Med*. 1994;235:467-481.
- Nielsen HK, Husted SE, Krusell LR, et al. Anticoagulant therapy in deep venous thrombosis: a randomized controlled study. *Thromb Res*. 1994;73:215-228.
- Cundiff DK. FDA approved anticoagulants that don't work. Available at: <http://hemetown.aol.com/~dkcundiff/home.htm>.

Response:

A significant omission in vena caval filters: a comprehensive review of phenylbutazone for venous thromboembolic disease

The purpose of my review was to examine the evidence supporting the efficacy and safety of vena caval filters in the prevention of venous thromboembolic disease (VTED).¹ The study mentioned by Dr Cundiff was not included because it did not examine the use of vena caval filters in VTED, the focus of

my article. But I would caution him not to conclude from the Nielsen study that there is no difference between standard anticoagulation and phenylbutazone in the treatment of VTED. The lack of a significant difference between the treatment groups in this study does not mean that they are necessarily

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación
Enero 6 de 2005 (06.01.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/000235 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes¹: C07H 21/04, A61K 48/00, C07K 14/00, 14/52

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2004/018962

(22) Fecha de Registro Internacional: Junio 14, 2004 (14.06.2004)

(23) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/478,205 Junio 13 de 2003 (13.06.2003) US
60/478,210 Junio 13 de 2003 (13.06.2003) US

(71) Solicitante: (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104-6283 (US).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): WEINER, David, B. [US/US]; 717 Beacon Lane, Merion, PA 19066 (US). KUTZLER, Michele [US/US]; 188 Penn Avenue, Souderton, PA 18964 (US). CHOO, Andrew, K. [US/US]; 796 Dunleavy Place, Lansdale, PA 19446 (US). YANG, Jee-Sung [KR/US]; Room 62207, Dept. Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-Dong, Jangsan-Ku, Suwon-City, Kyunggi-Do 440-746 (KR). BOYER, Jean, D. [US/US]; 215 Woodlane Avenue, Haddonfield, NJ 08033 (US).

(74) Agente: DELUCA, Mark; Cozen O'Connor, 1900 Market Street, Philadelphia, PA 19103 (US).

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eursiatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:
- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional: Junio 16 de 2005

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANTES Y COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN PÉPTIDOS DE SEÑAL IgE Y/O IL-15 Y MÉTODOS PARA EMPLEAR LOS MISMOS"

(57) Resumen: Se revelan proteínas de fusión y moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión. Se revelan las proteínas de fusión que comprenden el péptido de señal sin-IL-15 enlazado a secuencias de proteína IL-15 y proteínas de fusión que comprenden un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE. Se revelan los vectores que comprenden tales moléculas de ácido nucleico; y las células huésped que comprenden tales vectores como también las vacunas recombinantes y los patógenos vivos atenuados que codifican las proteínas de fusión, y los métodos para usar los mismos. Se revela el efecto inmunomodulatorio después de la liberación de IL-15 y CD40L, con o sin inmunogenos, como también varias moléculas de ácido nucleico y composiciones de las mismas empleadas para liberar tales proteínas y los métodos para usar tales composiciones.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 January 2005 (06.01.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/000235 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07H 21/04,
A61K 48/00, C07K 14/00, 14/52

(74) Agent: DELUCA, Mark; Cozen O'Connor, 1900 Market
Street, Philadelphia, PA 19103 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/018952

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(22) International Filing Date: 14 June 2004 (14.06.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60478,205 13 June 2003 (13.06.2003) US
60478,210 13 June 2003 (13.06.2003) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENN-
SYLVANIA [US/US]; 3160 Chestnut Street, Suite 200,
Philadelphia, PA 19104-6283 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WEINER, David,
B. [US/US]; 717 Beacon Lane, Merion, PA 19066 (US).
KUTZLER, Michele [US/US]; 188 Penn Avenue, Soud-
erton, PA 18964 (US). CHOO, Andrew, K. [US/US]; 796
Dunleavy Place, Lansdale, PA 19446 (US). YANG, Joo-
Sung [KR/US]; Room 62207, Dept. Genetic Engineer-
ing, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-Dong, Jan-
gan-Ku, Suwon-City, Kyunggi-Do 440-746 (KR). KWEER,
Jenn, D. [US/US]; 215 Woodlane Avenue, Haddonfield, NJ
08033 (US).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
16 June 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCES ENCODING AND COMPOSITIONS COMPRISING IgE SIGNAL PEPTIDE
AND/OR IL-15 AND METHODS FOR USING THE SAME

(57) Abstract: Fusion proteins and nucleic acid molecules encoding fusion proteins are disclosed. Fusion proteins comprising
non-IL-15 signal peptide linked to IL-15 protein sequences and fusion proteins comprising an IgE signal peptide linked to non-IgE
protein sequences are disclosed. Vectors comprising such nucleic acid molecules; and to host cells comprising such vectors are
disclosed as well as recombinant vaccines and live attenuated pathogens encoding fusion proteins, and methods of using the same, are
disclosed. The immunomodulatory effect following delivery of IL-15 and CD40L, with or without immunogens, is disclosed as are
various nucleic acid molecules and compositions thereof used for delivering such proteins and methods of using such compositions.

WO 2005/000235 A3

64

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:
MARK DELUCA
COZEN O'CONNOR
1900 MARKET STREET
PHILADELPHIA, PA 19103

PCT

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Regla 43bis.1)

Fecha de envío por correo
(día/mes/año) 7 de Abril de 2005

Registro de referencia del solicitante
o agente
UPAP0020-500

PARA FUTURAS ACCIONES
Ver párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No.

PCT/US04/18962

Fecha de registro internacional
(día/mes/año)
Junio 14 de 2004 (14.06.2004)

Fecha de prioridad
(día/mes/año)
Junio 13 de 2003 (13.06.2003)

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
IPC(7): CO7H 21/04; A61K 48/00; CO7K 14/00, 14/52 y US Cl.: 536/23.1, 23.4; 514/44; 530/350, 351

Solicitante

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Casilla No. I Bases de la opinión
- ☐ Casilla No. II Prioridad
- ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
- ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención
- ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación
- ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

2. ACCIONES FUTURAS

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de la ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O.Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Funcionario Autorizado

Ram Shukla
Teléfono No. (571) 272-0735

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud Internacional No.
PCT/US04/18962**

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:

☐ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:

☐ en formato escrito
☐ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:

☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud Internacional No. 67 PCT/US04/18962
--	---

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 5, 6, 8, 12-24, 28, 34-36 y 41-46

porque:

☐ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. 5, 6, 8, 12-24, 28, 34-36 y 41-46 son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

Las Reivindicaciones 5, 6, 8, 12-24, 28, 34 y 41-46 son reivindicaciones inapropiadamente multipledependientes. Las reivindicaciones 35 y 36 dependen de reivindicaciones que no fueron presentadas en la presente solicitud.

☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.

☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.

☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

☐ no se ha proporcionado

☐ no cumple con el estándar

el formato legible por computador

☐ no se ha proporcionado

☐ no cumple con el estándar

☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver la hoja separada para más detalles

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citasiones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1.	Declaración		
	Novedad (N)	Reivindicaciones 1-4, 7, 25-27, 29, 30-33, 37, 47,	SI
		Reivindicaciones 38-40, 48, 49-53	NO
	Nivel Inventivo (IS)	Reivindicaciones 30-33	SI
		Reivindicaciones 1-4, 7, 25-27, 29, 38-40, 37, 47-53	NO
	Aplicabilidad Industrial (IA)	Reivindicaciones 1-4, 7, 25-27, 29-33, 38-40, 37, 47-53	SI
		Reivindicaciones NINGUNA	NO

2. Citaciones y explicaciones

Por favor ver la hoja a continuación

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US04/18962

Casilla Suplementaria

En caso de que el espacio en cualquiera de las casillas anteriores no sea suficiente

V. 2. Citaciones y Explicaciones

Las reivindicaciones 38-40, 48 y 49-53 carecen de novedad bajo el artículo 33(2) de la PCT por estar anticipados por US 2002/0123099 A1 (WEINER et al) 5 de Septiembre de 2002 (5.9.2002).

WEINER et al proporciona una guía para la construcción de una molécula de ácido nucleico y la expresión de una secuencia amino ácida de la proteína cápsida (Cp) del tipo nativo (WNVC) del Virus del Nilo de Occidente (WNV) con constructos (Figura 1; pgph 2). WEINER et al enseña que una secuencia líder humana de la señal secretoria IgE fue fusionada a la proteína WNVC (pgph 2). En donde el WNCV es conocido por modular el sistema inmune mediante la inducción de la inflamación. Adicionalmente, WEINER et al. enseña un ácido nucleico y proteína de fusión que consiste de la secuencia líder secretoria de la señal IgE fusionada al gen pol VIH-1 (pgph 108), la cual es una enzima inmunogénica. Finalmente, WEINER et al, enseña que el constructo puede ser expresado en un sistema de expresión celular in vitro o inyectado directamente a un sujeto (pgph 7).

Las reivindicaciones 1-4, 25, 26, 27, 37, 47 carecen de nivel inventivo bajo el artículo 33(3) de la PCT por ser obvias con respecto a US 2002/0123099 A1 (WEINER et al) 5 de Septiembre de 2002 (5.9.2002) de acuerdo con RUCKERT et al, la proteína de fusión IL-15-IgG2b acelera y realiza un TH2, pero no una respuesta inmune in vivo de Th1, mientras que la proteína de fusión IL-2-IgG2b inhibe ambos. Eur. J. Immunol. december 1998, Vol. 28: 3312-3320.

WEINER et al proporciona una guía para la construcción de una molécula de ácido nucleico y la expresión de una secuencia amino ácida de la proteína cápsida (Cp) del tipo nativo (WNVC) del Virus del Nilo de Occidente (WNV) con constructos (Figura 1; pgph 2). WEINER et al enseña que una secuencia líder de la señal secretoria IgE fue fusionada a la proteína WNVC (pgph 2). En donde la WNCV es conocida por modular el sistema inmune mediante la inducción de la inflamación. Adicionalmente, WEINER et al. enseña un ácido nucleico y proteína de fusión que consiste de la secuencia líder secretoria de la señal IgE fusionada al gen pol VIH-1 (pgph 108). Finalmente, WEINER et al, enseña que el constructo puede ser expresado en un sistema de expresión celular in vitro o inyectado directamente a un sujeto (pgph 7), y que la secuencia líder de IgE puede estar fusionada a cualquier inmunogeno o proteína terapéutica (pgph 8). WEINER et al, también revela que sus sistema de expresión incrementa la eficiencia de traducción con respecto a los vectores y métodos existentes (pgph 8).

RUCKERT et al. proporciona una guía sobre la construcción de un constructo humano IL-15-IgG2b, su expresión y la proteína de fusión resultante (pg. 3318, Materiales y Métodos). RUCKERT et al, enseña que la proteína de fusión IL-15 es útil como un potente acelerador y realizador de respuestas inmunes del tipo TH2 (Resumen).

Un practicante del arte estaría motivado a colocar el uso de la secuencia IL-15 enseñada por RUCKERT et al, dentro del constructo enseñado por WEINER et al, con el fin de producir un péptido de señal IgE-proteína de fusión IL-15 y para administrarla directamente a un sujeto o para producir la proteína de fusión en un sistema celular in vitro para su uso posterior. Adicionalmente, el practicante estaría motivado a construir este constructo porque WEINER et al, enseña que el constructo IgE tiene una eficiencia de traducción superior que los métodos actuales y por ende, produciría mayores rendimientos de la proteína de fusión IgE-IL-15.

La persona versada en la técnica tendría una expectativa razonable de éxito porque la sustitución de la secuencia de ácido nucleico del inmunogeno enseñada por WEINER et al, con la secuencia de ácido nucleico IL-15 enseñada por RUCKERT et al, comprende una modificación menor del constructo, y los métodos para preparar y expresar los constructos de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

Casilla Suplementaria
En caso de que el espacio en cualquiera de las casillas anteriores no sea suficiente

Las reivindicaciones 7 y 29 carecen de nivel inventivo bajo el artículo 33(3) de la PCT por ser obvias con respecto al estado de la técnica como se aplicó en el párrafo inmediatamente precedente y adicionalmente en vista de WIERDA et al, Terapia por gen del ligando CD-40 (CD145) para leucemia linfocítica crónica. Blood, Noviembre 2000, Vol 96, páginas 2917-2924, y en vista de ANETHER et al, Interleucina-15 como citoquina co-estimuladora potencial en terapia por gen de CD154 de leucemia linfocítica crónica. Blood, Vol 99, páginas 722-723.

WIERDA et al proporciona una guía sobre la preparación y administración de un constructo humano CD40L para terapia de gen adenoviral (Resumen).

ANETHER et al, proporciona una guía sobre lo que los análogos IL-15 contribuyen a los efectos inmunológicos observados durante el tratamiento con el adenoviral CD40L enseñado por WIERDA et al (pg 723). Además, ANETHER et al, enseña que la citoquina puede ser usada como un adyuvante con el vector CD40L con el fin de incrementar los efectos terapéuticos (pg 723).

Un practicante del arte estaría motivado a colocar el uso de la secuencia IL-15 enseñada por RUCKERT et al, dentro del constructo enseñado por WIERDA et al, con el fin de producir y asegurar que sea producida la IL-15 junto con la CD40L durante la terapia por gen, incrementando así el efecto terapéutico de CD40L.

La persona versada en la técnica tendría una expectativa razonable de éxito porque la adición de la secuencia de ácido nucleico IL-15 enseñada por RUCKERT et al, al constructo CD40L enseñado por WIERDA et al, comprende una modificación menor del constructo, y los métodos para preparar y expresar los constructos de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

Las reivindicaciones 30-33 cumplen con los criterios establecidos en los artículos 33(2)-(3) de la PCT, porque el estado de la técnica no enseña o sugiere levemente un ácido nucleico que codifica IL-15, CD40L y un inmunogeno.

Las reivindicaciones 1-4, 7, 25-27, 29, 30-33, 37-40 y 47-53 cumplen con los criterios establecidos en el artículo 33(4) de la PCT, y por ende, tiene aplicación industrial porque la materia objeto reivindicada se puede preparar o utilizar en la industria.

From the

INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
 MARK DELUCA
 COZEN O'CONNOR
 1900 MARKET STREET
 PHILADELPHIA, PA 19103

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
 INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
 (day/month/year)

07 APR 2005

Applicant's or agent's file reference

UPAP0020-500

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US04/118962

International filing date (day/month/year)

14 June 2004 (14.06.2004)

Priority date (day/month/year)

13 June 2003 (13.06.2003)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): CO7H 21/04; A61K 48/00; CO7K 14/00, 14/52 and US CL: 536/23.1, 23.4; 514/44; 530/350, 351

Applicant

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
 Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Ram Shukla

Telephone No. (571) 272-0735

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US04/18962

Box No. 1 Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

- ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ in written format
☐ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US04/18962

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application
☒ claims Nos. 5,6,8,12-24,28,34-36 and 41-46

because:

- ☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 5,6,8,12-24,28,34-36 and 41-46 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 5,6,8,12-24,28,34 and 41-46 were improper multiple dependent claims. Claims 35 and 36 depended from claims that were not filed in the instant application.

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

- ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard

the computer readable form

- ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-61s of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

74

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/050418062

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bix.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>1-4,7,25-27,29,30-33,37,47.</u>	YES
	Claims <u>38-40, 48, 49-53</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>30-33</u>	YES
	Claims <u>1-4,7,25-27,29,38-40,37,47-53</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-4,7,25-27,29-33,38-40,37,47-53</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Please See Continuation Sheet

77

75

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US04/1882

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

V. 2. Citations and Explanations:

Claims 38-40, 48 and 49-53 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2002/0123099 A1 (WEINER et al.) 5 September 2002 (5.9.2002).

WEINER et al. provides guidance on the construction of a nucleic acid molecule and the expression of a amino acid sequence of the West Nile Virus (WNV) wild type capsid (Cp) protein (WNVC) with constructs (Figure 1; pgph 2). WEINER et al. teaches a human secretory IgE signal leader sequence was fused to the WNVC protein (pgph 2). Where the WNCV is known to modulate the immune system by inducing inflammation. Further, WEINER et al. teaches a nucleic acid and fusion protein consisting of the secretory IgE signal leader sequence fused to the HIV-1 pol gene (pgph 108), which is an immunogenic enzyme. Finally, WEINER et al. teaches that the construct can be expressed in an in vitro cell expression system or directly injected to a subject (pgph 7).

Claims 1-4, 25, 26, 27, 37, 47 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2002/0123099 A1 (WEINER et al.) 5 September 2002 (5.9.2002) in view of RUCKERT et al. IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a TH2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both. Eur. J. Immunol. December 1998, Vol. 28: 3312-3320.

WEINER et al. provides guidance on the construction of a nucleic acid molecule and the expression of a amino acid sequence of the West Nile Virus (WNV) wild type capsid (Cp) protein (WNVC) with constructs (Figure 1; pgph 2). WEINER et al. teaches a secretory IgE signal leader sequence was fused to the WNVC protein (pgph 2). Where the WNCV is known to modulate the immune system by inducing inflammation. Further, WEINER et al. teaches a nucleic acid and fusion protein consisting of the secretory IgE signal leader sequence fused to the HIV-1 pol gene (pgph 108). Finally, WEINER et al. teaches that the construct can be expressed in an in vitro cell expression system or directly injected to a subject (pgph 7), and that the IgE leader sequence can be fused to any immunogen or therapeutic protein (pgph 8). WEINER et al. also discloses that his expression system increases translational efficiency over existing vectors and methods (pgph 6).

RUCKERT et al. provides guidance on the construction of a human IL-15-IgG2b construct, its expression and the resulting fusion protein (pg. 3318, Materials and methods). RUCKERT et al. teaches that the IL-15 fusion protein is useful for as a potent accelerator and enhancer of TH2 type immune responses. (Abstract).

A practitioner in the art would be motivated to place the use the IL-15 sequence taught by RUCKERT et al. into the construct taught by WEINER et al. in order to produce a IgE signal peptide-IL-15 fusion protein order to administer it directly to a subject or to produce the fusion protein in an in vitro cell system for later use. Further, the practitioner would be motivated to build this construct because WEINER et al. teaches that the IgE construct has greater translational efficiency than current methods and thus would produce greater yields of IgE-IL-15 fusion protein.

The person of ordinary skill in the art would have a reasonable expectation of success because the substitution of the immunogen nucleic acid sequence taught by WEINER et al. with the IL-15 nucleic acid sequence taught by RUCKERT et al. comprises a minor modification of the construct and methods of making

78

26

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US99/18962

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

and expressing nucleic acid constructs are well known in the art.

Claims 7 and 29 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over the prior art as applied in the immediately preceding paragraph and further in view of WIERDA et al. CD40-ligand (CD145) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. Blood, November 2000, Vol 96, pages 2917-2924, and in view of ANETHER et al. Interleukin-15 as a potential costimulatory cytokine in CD154 gene therapy of chronic lymphocytic leukemia. Blood. Vol 99, pages 722-723.

WIERDA et al. provides guidance on the making and administration of a human CD40L construct for adenoviral gene therapy (Abstract).

ANETHER et al. provides guidance that autologous IL-15 contributes to the immunological effects observed during treatment with the CD40L adenoviral taught by WIERDA et al. (pg. 723). Further, ANETHER et al. teaches that the cytokine may be used as an adjuvant with the CD40L vector in order to increase the therapeutic effects (pg. 723).

A practitioner in the art would be motivated to place the use the IL-15 sequence taught by RUCKERT et al. into the construct taught by WIERDA et al. in order to produce insure that IL-15 was produced along with CD40L during gene therapy, thus increasing the therapeutic effect of CD40L.

The person of ordinary skill in the art would have a reasonable expectation of success because the addition of the IL-15 nucleic acid sequence taught by RUCKERT et al. to the CD40L construct taught by WIERDA et al. with comprises a minor modification of the construct and methods of making and expressing nucleic acid constructs are well known in the art.

Claims 30-33 the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest a nucleic acid encoding IL-15, CD40L and an immunogen.

Claims 1-4, 7, 25-27, 29, 30-33, 37-40 and 47-53 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

79

SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANTES Y COMPOSICIONES
QUE COMPRENDEN PÉPTIDOS DE SEÑAL IgE Y/O IL-15 Y MÉTODOS
PARA EMPLEAR LOS MISMOS.

5

Resumen-Objeto y Finalidad de la Invención

Se revelan proteínas de fusión y moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión. Se revelan las proteínas de fusión que comprenden el péptido de señal sin-IL-15 enlazado a secuencias de proteína IL-15 y proteínas de fusión que comprenden un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE. Se revelan los vectores que comprenden tales moléculas de ácido nucleico; y las células huésped que comprenden tales vectores como también las vacunas recombinantes y los patógenos vivos atenuados que codifican las proteínas de fusión, y los métodos para usar los mismos. Se revela el efecto inmunomodulatorio después de la liberación de IL-15 y CD40L, con o sin inmunógenos, como también varias moléculas de ácido nucleico y composiciones de las mismas empleadas para liberar tales proteínas y los métodos para usar tales composiciones.

SECUENCIAS DE ÁCID NUCLEIC C DIFICANTES Y COMP SICI NES
QUE COMPRENDEN PÉPTIDOS DE SEÑAL IgE Y/O IL-15 Y MÉTODOS
PARA EMPLEAR LOS MISMOS.

5 Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con vacunas mejoradas, métodos mejorados para inmunizar profilácticamente y/o terapéuticamente individuos contra inmunogenos, y a composiciones inmunoterapéuticas mejoradas y métodos de inmunoterapia mejorados.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunoterapia se refiere a la modulación de las respuestas inmunes de una persona para impartir un efecto terapéutico deseable. Los inmunoterapéuticos se refiere a aquellas composiciones que, cuando son

15 administradas a un individuo, modulan el sistema inmune de los individuos lo suficiente como para disminuir finalmente los síntomas asociados con las respuestas inmunes indeseables o para aliviar finalmente los síntomas mediante el incremento de respuestas inmunes deseables. En algunos casos, la inmunoterapia es parte de un protocolo de vacunación en el cual al individuo

20 les es administrada una vacuna que expone el individuo a un inmunogeno contra el cual el individuo genera una respuesta inmune. En tales casos, los inmunoterapéuticos incrementan la respuesta inmune y/o realizan selectivamente una porción de la respuesta inmune (tal como el brazo celular o el brazo humoral) lo cual es deseable para tratar o prevenir la condición

25 particular, infección o enfermedad.

Las vacunas son útiles para inmunizar los individuos contra antígenos objetivo tales como alérgenos, antígenos patógenos o antígenos asociados con células involucradas en enfermedades humanas. Los antígenos asociados con células involucradas en enfermedades humanas incluyen antígenos de tumor asociados con cáncer y antígenos asociados con células involucradas en enfermedades autoinmunes.

En el diseño de tales vacunas, se ha reconocido que las vacunas que producen el antígeno objetivo en células de los individuos vacunados son efectivas en inducir el brazo celular del sistema inmune. Específicamente, vacunas vivas atenuadas, vacunas recombinantes que emplean vectores avirulentos, y vacunas de ADN cada una de las cuales conduce a la producción de antígenos en las células del individuo vacunado, lo cual resulta en la inducción del brazo celular del sistema inmune. De otra parte, las vacunas muertas o inactivadas, y vacunas de sub-unidades que comprenden solamente proteínas no inducen buenas respuestas inmunes celulares aunque inducen una respuesta humoral.

Una respuesta inmune celular es con frecuencia necesaria para proporcionar protección contra infecciones patógenas y para proporcionar una terapia mediada por inmune efectiva para el tratamiento de infecciones patógenas, cáncer o enfermedades autoinmunes. Por consiguiente, con frecuencia se prefieren las vacunas que producen el antígeno objetivo en las

células de los individuos vacunados tales como vacunas vivas atenuadas, vacunas recombinantes que usan vectores avirulentos y vacunas de ADN.

Mientras que tales vacunas son frecuentemente efectivas para inmunizar
5 profilácticamente o terapéuticamente individuos contra infecciones patógenas o enfermedades humanas, existe la necesidad de vacunas mejoradas. Existe la necesidad de composiciones y métodos que produzcan una respuesta inmune mejorada.

10 De otra parte, aunque que algunos inmunoterapéuticos son útiles para modular la respuesta inmune en un paciente, aun permanece la necesidad por composiciones inmunoterapéuticas y métodos mejorados.

La terapia de gen se refiere a la liberación de genes a un individuo que
15 necesita o de otra forma se beneficia por la proteína codificada por la proteína. Se han desarrollado numerosas estrategias para liberar proteínas para las cuales los individuos no tienen un gen correspondiente que produzca proteína suficiente y/o completamente funcional. Así, la terapia de gen compensa la carencia de suficiente proteína de funcionamiento completamente endógeno.
20 En alguna estrategia de terapia por gen, al paciente se le proporciona una proteína terapéuticamente efectiva empleando constructos diseñados para producir una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína. La terapia por gen proporciona un método alternativo para la liberación de proteínas terapéuticas. Existe una necesidad por composiciones y métodos de terapia de
25 gen mejorados.

En adición a la administración directa de moléculas de ácidos nucleicos a individuos, con frecuencia son liberadas proteínas. La producción de tales proteínas mediante métodos recombinantes es con frecuencia la forma más eficiente de fabricarlas. Aun permanece la necesidad de composiciones y métodos mejorados para la manufactura de proteínas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con vacunas recombinantes que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal no-IL-15 enlazada a secuencias de proteínas IL-15 y opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L; y a métodos para inmunizar a un individuo contra un inmunogeno que comprende la administración al individuo de tales vacunas recombinantes.

La presente invención se relaciona con patógenos vivos atenuados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a secuencias de proteína IL-15 y opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L; a métodos para inmunizar un individuo; a métodos para inmunizar un individuo contra un patógeno, que comprende la administración a un individuo de tales patógenos vivos atenuados.

La presente invención se relaciona con moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína IL-15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD40L, y opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno.

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico codifica la proteína IL-15 y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD40L, y opcionalmente, sobre cualquiera o ambas moléculas de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno.

La presente invención se relaciona con un método para modular una respuesta inmune en un individuo, el cual comprende la administración a un individuo de una composición que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD40L. Las varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican las varias proteínas diferentes pueden estar sobre la misma molécula de ácido nucleico y/o diferente molécula de ácido nucleico o ambas.

La presente invención se relaciona con un método para inducir una respuesta inmune contra un inmunogeno en un individuo, el cual comprende la

administración a un individuo de una composición que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno y una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L. Las varias
5 secuencias de ácidos nucleicos que codifican las varias proteínas diferentes pueden estar sobre la misma molécula de ácido nucleico y/o diferente molécula de ácido nucleico o combinaciones de las mismas.

La presente invención se relaciona con vacunas recombinantes que
10 comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L; y a métodos para inmunizar un individuo contra un inmunogeno que comprende la administración a un individuo de tales vacunas recombinantes.

15

La presente invención se relaciona con patógenos vivos atenuados que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L; y a métodos para inmunizar un individuo contra un
20 patógeno que comprende la administración a un individuo de tales patógenos vivos atenuados.

La presente invención se relaciona con moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas de
25 fusión que consisten de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de

proteína sin-IgE, en donde el péptido de señal IgE y las secuencias de proteínas sin IgE son derivadas de las mismas especies animales.

La presente invención se relaciona con cultivos de células huésped in vitro que comprende vectores de expresión operables en tales células huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas de fusión que consisten de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE; a tales moléculas de ácidos nucleicos; y a células huésped que comprenden tales vectores.

10

La presente invención se relaciona con moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión que consisten de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE enlazadas de manera operable a elementos reguladores requeridos para la expresión y secuencias de ácidos nucleicos que codifican un inmunogeno enlazado de manera operable a elementos reguladores requeridos para la expresión.

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión que consisten de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE y moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican un inmunogeno, en donde las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión

20

no son idénticas a las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican el Inmunogeno.

La presente invención se relaciona con proteínas de fusión aisladas que
5 comprenden un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE.

La presente invención se relaciona con métodos para modular una
respuesta inmune en un individuo, el cual comprende la administración a un
10 individuo de una composición que comprende una molécula de ácido nucleico
que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión
que comprenden un péptido de señal IgE enlazado operablemente a
secuencias de proteínas sin-IgE.

15 La presente invención se relaciona con métodos para inducir una
respuesta inmune contra un inmunogeno en un individuo, el cual comprende la
administración a un individuo de moléculas de ácido nucleico que comprende
una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que
comprende un péptido de señal IgE enlazado a una proteína
20 inmunomodulatoria y una secuencia de ácido nucleico que codifica un
inmunogeno. Las varias secuencias que codifican para las diferentes proteínas
pueden estar sobre la misma molécula de ácido nucleico y/o diferente molécula
de ácido nucleico.

La presente invención se relaciona con vacunas recombinantes que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprendn una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal IgE
5 enlazada a una proteína inmunomoduladora; y a métodos para inmunizar un individuo contra un inmunogeno que comprendde la administración a un individuo de tales vacunas recombinantes.

La presente invención se relaciona con patógenos vivos atenuados que
10 comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal IgE enlazada a una proteína inmunomodulante; y a métodos para inmunizar un individuo contra un patógeno, el cual comprende la administración a un individuo de tales patógenos vivos atenuados.

15

La presente invención se relaciona con moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína IL-15; a vectores que comprenden dichas moléculas de ácidos
20 nucleicos; y a células huésped que comprenden dichos vectores.

La presente invención se relaciona con proteínas de fusión que comprenden un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína IL-15.

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína IL-15, y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno. Opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L puede estar presente en moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión y/o el inmunogeno o en una molécula de ácido nucleico separada.

10

La presente invención se relaciona con métodos para modular una respuesta inmune en un individuo, el cual comprende la administración a un individuo de una composición que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido de señal IgE enlazado a una proteína IL-15, y opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L. Las varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican las varias proteínas diferentes pueden estar sobre la misma molécula de ácido nucleico y/o diferente molécula de ácido nucleico o ambas.

20

La presente invención se relaciona con un método para inducir una respuesta inmune contra un inmunogeno en un individuo, el cual comprende la administración a un individuo de una composición que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido de señal IgE

25

enlazado a secuencias de proteína IL-15, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno y opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L. Las varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican las varias proteínas diferentes pueden estar sobre la misma molécula de ácido nucleico y/o diferente molécula de ácido nucleico o combinaciones de las mismas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra datos del Ejemplo 1 que muestran la producción de IFN- γ después de la estimulación de PBMCs humano con IL-15 y anticuerpo monoclonal para CD3. Los PBMCs se obtuvieron a partir de sujetos infectados crónicamente con VIH-1 siendo tratados con terapia triple (HAART). Todas las cargas virales de los donores estaban por debajo de 500 copia/ml y sus cuentas de CD4 estaban por encima de 500 células/ml. Para determinar si IL-15 realzo la producción de IFN- γ como un indicador de la función efectora, las células fueron estimuladas con IL-15 y anti-CD3 y analizadas mediante un ensayo patrón de ELISPOT.

La Figura 2 ilustra datos del Ejemplo 1 que muestran que la producción de IFN- γ después de la estimulación de PBMCs humano con IL-15 y anticuerpo monoclonal para CD3, es predominantemente mediada por CD8. Los PBMCs de sujetos infectados crónicamente con VIH-1 siendo tratados con terapia triple (HAART) como se describió en la Figura 1 fueron agotados en células T CD4 o CD8 y posteriormente estimuladas con IL-15 y anti-CD3 y analizadas mediante un ensayo patrón de ELISPOT.

Las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D ilustran datos del Ejemplo 1 que muestran la producción del antígeno específico de IFN- γ después de la estimulación de PBMCs humano con péptidos VIH-1 e IL-15. Los PBMCs obtenidos a partir de sujetos infectados crónicamente con VIH-1 siendo tratados con terapia triple (HAART) fueron analizados por su capacidad para secretar IFN- γ en respuesta a 25ng/ml de IL-15 (Figuras 3A y 3C) y a péptidos Gag VIH-1 en combinación con IL-15 (Figuras 3B y 3C) en un ensayo patrón de ELISPOT. Las CD8 fueron agotadas y se evaluó la producción de IFN- γ después de la estimulación con péptidos VIH-1 e IL-15 (Figura 3D).

La Figura 4, paneles A, B y C ilustran datos del Ejemplo 1 que muestran respuestas celulares inmunes a antígeno específico después de la inmunización con vacuna de ADN VIH-1 e IL-15. Ratones Balb/c fueron co-inyectados en las semanas 0 y 2 con 50 μ g de pCenv o pCgag con 50 μ g del pIL-15 un plásmido que expresa IL-15. Los esplenocitos fueron cosechados durante dos semanas después de la inmunización final. En la Figura 4, panel A, los esplenocitos fueron evaluados mediante un ensayo patrón de liberación de Cromo para actividad CTL contra vacunas de envoltura de VIH-1 y recombinantes infectadas con células P815. En la figura 4, panel B, se analizó el nivel de secreción de quimquina específica del antígeno HIV-1. Los esplenocitos fueron estimulados con vacuna recombinante env VIH-1 infectada con células P815. Los sobrenadantes fueron sembrados en el tercer día y se evaluaron para secreción de MIP-1 β . In la Figura 4, panel C, se evaluó el nivel de secreción específica de antígeno del IFN-gama. Los esplenocitos fueron re-

suspendidos a una concentración de 5×10^5 células/ml. Se adicionó una alícuota de 100 µl a cada pozo de una placa de fondo plano de 96 pozos de microtitulación. Se adicionó proteína recombinante p24 a los pozos por triplicado resultando en concentraciones finales de 5 µg/ml y 1 µg/ml. Las células fueron incubadas a 37°C en 5% de CO₂ durante tres días y se sembraron los sobrenadantes. Se determinaron los niveles de citoquina secretada empleando kits ELISA disponibles comercialmente.

La Figura 5, paneles A y B ilustran datos del Ejemplo 1 que muestran tinción intracelular para citoquinas Th 1. Se suministraron dos inyecciones a los ratones con pCgag solo o con pCgag más plásmidos de ADN pIL-15. Una semana después, se sembraron los esplenocitos y se cultivaron *in vitro* durante cinco horas en un medio que contiene un juego de péptidos p55 (que contienen 127 15mers que abarcan p55 VIH-1 con superposiciones de 11aa) y Brefeldin A. Después de la estimulación, las células fueron teñidas extracelularmente con anticuerpos anti-ratón CD3 y anti-ratón CD8 y posteriormente intracelularmente con anti-ratón. La Figura 5, panel A, muestra datos para IFN-γ. La Figura 5, panel B, muestra datos para Tumor Necrosis Factor-α. Las representaciones de puntos representan las respuestas de linfocitos CD3+/CD8+.

La Figura 6 ilustra datos del Ejemplo 1 de los ensayos de proliferación de células auxiliares T murina. Ratones Balb/c fueron co-inyectados en las semanas 0 y 2 con 50 µg de pCgag o pCenv y 50 µg de los plásmidos que expresan cADNs de citoquinas Th1 dependientes de IL-2R, IL-2 o IL-15. Se

adicionó inmediatamente una alícuota de 100 µg l que contiene 5x10 células a cada pozo de una placa de fondo plano de 96 pozos de microtitulación. Se adicionó proteína recombinante p24 a los pozos por triplicado resultando en concentraciones finales de 5 µg/ml y 1 µg/ml. Se determinó el índice de estimulación. Los pozos de conteo espontáneos incluyeron suero fetal de temero al 10%, los cuales sirven como control irrelevante de proteína. De manera similar, el pCgag o control rutinariamente tiene un SI de 1 contra su proteína gp 120 irrelevante. Para asegurar que las células son saludables, se empleo PHA o Con (Sigma) como un control policlonal estimulador positivo.

10

La Figura 7 ilustra datos del Ejemplo 1 a partir del mapeado del epítipo de Gag en ratones Balb/c después de la inmunización con vacuna de ADN pCgag. Ratones Balb/c fueron co-inyectados en las semanas 0 y 2 con 50 µg de pCgag y 50 µg del plásmido pIL-15 o con un armazón de vector que exprese genes IL-15 o un armazón de vector. Los esplenocitos fueron aislados y dispuestos en un ensayo de ELISPOT patrón empleando una serie de péptidos. Los péptidos fueron mezclados en una serie de 22 juegos en un formato de matriz y evaluados por su capacidad para activar las células para producir IFN-γ.

20

La Figura 8, paneles A, B y C ilustran datos del Ejemplo 1 que muestran la producción de IFN-γ después de la estimulación de esplenocitos derivados de ratones CD4. En la figura 8, panel A, los ratones Balb/c fueron co-inyectados en las semanas 0 y 2 con 50 µg de pCgag con 50 µg del pIL-15, un plásmido que expresa IL-15. Los esplenocitos fueron cosechados durante dos

25

semanas después de la inmunización final y se evaluaron para la producción específica de VIH-1 de IFN- γ mediante ELISPOT. En la Figura 8, panel B, los ratones Cd4^{tm1K^{mw}}, fueron inmunizados con pCgag con y sin pIL-15. En la Figura 8, panel C, los ratones Cd4^{tm1K^{mw}}, fueron inmunizados con pCgag en combinación con cualquiera de pIL-15, pCD40L o ambos. Los esplenocitos fueron cosechados durante dos semanas después de la inmunización final y se evaluaron para la producción específica de VIH-1 Gag de IFN-gama después de la estimulación *in vitro* con péptidos VIH-1 Gag.

10 La Figura 9 ilustra datos del Ejemplo 2 que muestran la producción local de IL-15 y CD40L en el sitio de la vacuna puede reemplazar el requerimiento para el auxiliar de la célula T para la expansión de las células T efectoras CD8.

La Figura 10, Figura 11, Figura 12, paneles A-C, Figura 13, paneles A-B, 15 14 y 15 se refieren a las revelaciones establecidas en el Ejemplo 3.

La Figura 16 se refiere a datos de las revelaciones establecidas en el Ejemplo 4.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Definiciones

Como se usa en la presente, el término "proteína objetivo" significa que se refiere a péptidos y proteínas codificadas por constructos de genes de la presente invención que actúan como proteínas objetivo para una respuesta 25 inmune. Los términos "proteína objetivo" e "inmunogeno" son empleados de

manera intercambiable y se refieren a una proteína contra la cual se puede elicitar una respuesta inmune. La proteína objetivo es una proteína inmunogénica que comparte al menos un epítipo con una proteína del patógeno o el tipo de célula indeseable, tales como células de cáncer o células involucradas en enfermedades autoinmunes contra las cuales se desea una respuesta inmune. La respuesta inmune dirigida contra la proteína objetivo protegerá al individuo contra y/o tratará al individuo de la infección o enfermedad específica con la cual está asociada la proteína objetivo.

10 Como se usa en la presente, el término "constructo genético" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia nucleotida que codifica una proteína objetivo o proteína inmunomodulante. La secuencia codificante incluye señales de iniciación y terminación enlazadas de manera operable a elementos regulatorios que incluyen un promotor y señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células del individuo a quien se administra la molécula de ácido nucleico.

20 Como se usa en la presente, el término "forma expresable" se refiere a constructos de genes que contienen los elementos regulatorios necesarios enlazados de manera operable a una secuencia codificante que codifica una proteína objetivo o una proteína inmunomodulante, tal que cuando está presente en la célula del individuo, será expresada la secuencia codificante.

Como se usa en la presente, el término "compartir un epítopo" se refiere a proteínas que comprenden al menos un epítopo que es idéntico a o sustancialmente similar a un epítopo de otra proteína.

5 Como se usa en la presente, el término "epítopo sustancialmente similar" se refiere a un epítopo que tiene una estructura que no es idéntica a un epítopo de una proteína, pero no obstante invoca una respuesta inmune celular o humoral que inter-reacciona a esa proteína.

10 Como se usa en la presente, el término "patógeno intracelular" se refiere a un virus u organismo patogénico que, al menos en parte de su ciclo de vida reproductiva, existe dentro de una célula huésped y por ende produce o causa que se produzcan, proteínas patógenas.

15 Como se usa en la presente, el término "enfermedades hiperproliferativas" se refiere a aquellas enfermedades y desordenes caracterizados por la hiperproliferación de células.

 Como se usa en la presente, el término "proteína hiperproliferativa-
20 asociada" se refiere a proteínas que están asociadas con una enfermedad hiperproliferativa.

 Como se usa en la presente, el término "proteína inmunomodulante" se refiere a una proteína que modula el sistema inmune de una persona a quien
25 se libera la proteína inmunomodulante. Ejemplos de proteínas

inmunomodulatorias incluyen: IL-15, CD40L, TRAIL; TRAILrecDRC5, TRAIL-
 R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND,
 NKG2D, F461811or MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F,
 CD30, CD153 (CD30L), Fos, c-jun, Sp-1, Ap1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88,
 5 IRAK, TRAF6, I κ B, NIK, SAP K, SAP1, JNK2, JNK1B2, JNK1B1, JNK2B2,
 JNK2B1, JNK1A2, JNK2A1, JNK3A1, JNK3A2, NF-kappa-B2, forma de
 empalme p49, NF-kappa-B2, forma de empalme p100, NF-kappa-B2, forma de
 empalme p105, precursor de la cadena NF-kappa-B 50K, NF κ B p50, IL-1
 humano, IL-2 humano, IL-4 humano, IL-4 murina, IL-5 humano, IL-10 humano,
 10 IL-15 humano, IL-18 humano, TNF- α humano, TNF- β humano, interleucina 12
 humana, MadCAM-1, NGF IL-7, VEGF, TNF-R, Tas, CD40L, IL-4, CSF, G-CSF,
 GM-CSF, M-CSF, LFA-3, ICAM-3, ICAM-2, ICAM-1, PECAM, P150.95, Mac-1,
 LFA-1, CD34, RANTES, IL-8, MIP-1 α , E-selecton, CD2, MCP-1, L-selecton, P-
 selecton, FLT, Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR,
 15 LARD, NGRF, DR4(TRAIL), DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, ICE, VLA-
 1, y CD86 (B7.2)

Descripción

La invención surge de los siguientes descubrimientos 1) los niveles de
 20 expresión de la proteína IL-15 son más altos cuando no está presente el
 péptido de señal IL-15, sea que la proteína IL-15 es expresada como una
 proteína IL-15 "truncada" o como una proteína de fusión que comprende las
 secuencias de proteína IL-15 enlazadas a un péptido sin señal IL-15,
 particularmente, el péptido de señal IgE. La proteína IL-15 libre del péptido de
 25 señal IL-15, sea una proteína IL-15 "truncada" o como una proteína de fusión

que comprende las secuencias de proteína IL-15 enlazadas a un péptido sin señal IL-15, particularmente, un péptido de señal IgE, son particularmente útiles en vacunas y en constructos para la liberación de proteína IL-15 como una proteína inmunomodulante. 2) las vacunas y composiciones

5 inmunomodulatorias que involucran la liberación de IL-15 en combinación con CD40L son particularmente útiles. 3) Las proteínas de fusión que comprenden el péptido de señal IgE facilitan la expresión mejorada y son particularmente, *inter alia*, útiles en la producción de proteínas, vacunas y terapéuticos de genes

tales como para la liberación de proteínas tales como proteínas

10 inmunomodulantes. En algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona vectores, vacunas y composiciones y métodos inmunomoduladores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias nucleótidas que codifican: proteínas que incluyen IL-15 humano que codifican secuencias libres del péptido de señal IL-15 y

15 preferiblemente libre de la región Kozak IL-15 y regiones no traducidas; o se proporcionan proteínas de fusión en las cuales secuencias codifican el IL-15 humano con un péptido sin señal IL-15, preferiblemente, la secuencia de señal IgE. Las secuencias que codifican IL-15 son preferiblemente libres de la secuencia de señal IL-15, y preferiblemente libres de la región Kozak IL-15 y

20 regiones no traducidas. En algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona vectores, vacunas y composiciones y métodos inmunomodulatorios que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias nucleótidas que codifican 1) una proteína IL-15, tal como una proteína IL-15 libre libre del péptido de señal IL-15, o una proteína de

25 fusión que comprende las secuencias de la proteína IL-15 enlazadas a un

péptido sin señal IL-15, tales como un péptido de señal IgE, en combinación con 2) secuencias nucleotidas que codifican CD40L humano. Las secuencias que codifican IL-15 son preferiblemente libres de la secuencia de señal IL-15, y preferiblemente libres de la región Kozak IL_15 y regiones no traducidas. En 5 algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona vectores, vacunas y composiciones y métodos inmunomodulatorios que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias nucleotidas que codifican proteínas de fusión en las cuales el péptido de señal IgE está enlazado a una secuencia de proteína sin IgE, preferiblemente secuencias de proteína IL-15 10 humana.

Proteínas de fusión que comprenden constructos genéticos que codifican secuencias de señal IgE enlazada a proteína sin IgE.

Así, un aspecto general de la invención se relaciona con proteínas de 15 fusión que comprenden constructos genéticos que codifican la secuencia de señal IgE enlazada a una proteína sin-IgE, y al uso de tales constructos en vectores de expresión, vacunas y composiciones inmunomodulatorias. Se proporcionan varias realizaciones y formas diferentes con respecto a éste aspecto.

20

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una molécula aislada de ácido nucleico que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal IgE enlazada de manera operable a una 25 secuencia de proteína sin IgE.

La naturaleza de la proteína sin-IgE es dependiente del uso intentado para los constructos. Por ejemplo, en las realizaciones de terapias con genes, las secuencias de proteína serían aquellas de una proteína deseada tal como una proteína para la cual el paciente carece de cantidades suficientes de una proteína en funcionamiento o en completo funcionamiento. Ejemplos de este tipo de proteínas deseada incluyen enzimas tales como ADNasa, factores de crecimiento tales como la hormona del crecimiento (humana, bovina, porcina), factores de coagulación, insulina, distrofina, y similares. La proteína deseada también puede ser aquella que cuando se expresa en el paciente proporciona un beneficio terapéutico tales como la eritropoietina, IL-2, GM-CSF, TPA, y similares. En algunas realizaciones, la secuencia de la proteína sin IgE es un inmunogeno. Tales constructos son útiles en vacunas en las cuales la expresión del inmunogeno se proporciona como un objetivo para una respuesta inmune. En algunas realizaciones, la secuencia de la proteína sin IgE es una proteína inmunomodulante. Tales constructos son útiles en vacunas en las cuales la expresión del inmunogeno se proporciona como un objetivo para una respuesta inmune como también composiciones inmunomodulatorias en las cuales el efecto deseado es tener el sistema inmune de un paciente, o un aspecto específico del sistema inmune regulando hacia arriba o regulando hacia abajo dependiendo de la condición del paciente tratado. Los inmunomoduladores que regulan hacia arriba el sistema inmune son útiles para tratar pacientes que sufren de inmunosupresión o enfermedades infecciosas, por ejemplo, mientras que aquellos que regulan hacia abajo, el sistema inmune son útiles, por ejemplo, para tratar enfermedades autoinmunes, pacientes que

reciben transplantes de órganos; injertos de tejidos o terapia de células para quienes es deseable la supresión inmune. En algunas realizaciones, la secuencia de la señal IgE está enlazada a una secuencia de proteína sin IgE para ser usada en un sistema en el cual es deseable la producción de la proteína IgE. En realizaciones preferidas, el péptido de señal IgE se deriva de las mismas especies de animal como las secuencias de proteína a las cuales está enlazada. En métodos preferidos, el animal al cual se le administran tales constructos es de la misma especie que el animal para el cual se derivan la secuencia de proteína y péptido de la señal IgE. Tales proteínas de fusión se considerarían como no-inmunogénicos.

En algunas realizaciones, las composiciones que incluyen un constructo el cual comprende secuencias codificantes de la señal IgE enlazada a una secuencia de proteína sin-IgE, que son proteínas inmunomodulantes, también puede incluir sobre la misma molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico diferente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno. Generalmente, los inmunogenos, que son discutidos más adelante, pueden ser cualquier proteína inmunogénica que incluye alérgenos, antígenos patógenos, antígenos asociados con cáncer o antígenos enlazados a células asociadas con enfermedades autoinmunes. En realizaciones preferidas, el inmunogeno es un antígeno patógeno, más preferiblemente un patógeno seleccionado del grupo que consiste de VIH, VSH, VCH y VNW.

Como se notó anteriormente, la secuencia de proteína sin-IgE es preferiblemente una proteína IL-15, más preferiblemente una proteína IL-15

libre de la secuencia de señal IL-15, más preferiblemente, una proteína IL-15 libre de la secuencia de señal IL-15, libre de la región Kozak IL-15, y libre de las secuencias IL-15 no traducidas. En algunas realizaciones preferidas, tales composiciones además comprenden una secuencia nucleotida que codifica
5 CD40L. Esta secuencia nucleotida puede ser incluida sobre la misma molécula de ácido nucleico como la proteína de fusión o una molécula diferente. El CD40L puede ser incluido en composiciones de vacuna que incluyen secuencias que codifican para inmunogenos, produciendo vacunas mejoradas. En otras realizaciones, el CD40L puede ser incluido en composiciones
10 inmunomodulatorias que no incluyen secuencias codificantes para inmunogenos, produciendo composiciones inmunomodulatorias mejoradas.

En algunas realizaciones preferidas, los constructos de ácidos nucleicos son plásmidos. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido
15 nucleico es incorporada en un vector viral tal como vacunas, adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus, o cualquier otro vector viral aceptable útil como vacuna o vector de terapia de gen.

Los constructos genéticos comprenden las secuencias de señal IgE
20 enlazadas a una secuencia de proteína sin-IgE que son proteínas inmunomodulantes que pueden ser incorporadas directamente dentro de patógenos vivos atenuados de acuerdo con algunos aspectos de la invención. Ejemplos de tales patógenos útiles como vacunas son señalados más adelante. En realizaciones preferidas, la proteína inmunomodulante es IL-15,
25 más preferiblemente proteína IL-15 libre de la secuencia de señal IL-15, más

preferiblemente proteína IL-15 libre de la secuencia de señal IL-15 libre de la región Kozak IL-15; y libre de las secuencias IL-15 no traducidas. En algunas realizaciones, tales patógenos atenuados son proporcionados además con una secuencia nucleotida que codifica CD40L.

5

También son aspectos de la invención una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal IgE enlazada de manera operable a secuencias de proteína sin IgE. En algunas realizaciones, la porción de la secuencia de proteína sin-IgE de la proteína de fusión es una enzima. En algunas realizaciones, la porción de la secuencia de proteína sin-IgE de la proteína de fusión es un inmunogeno. En algunas realizaciones, la porción de la secuencia de proteína sin-IgE de la proteína de fusión es una proteína inmunomodulante. La secuencia de proteína sin-IgE preferida es la proteína IL-15, más preferiblemente libre de la secuencia de la señal IL-15.

15

Proteínas de fusión que comprenden constructos genéticos que codifican una secuencia de señal sin IL-15 enlazada a una proteína IL-15.

Un aspecto general de la invención se relaciona con proteínas de fusión que comprenden constructos genéticos que codifican una secuencia de señal sin IL-15 enlazada a una proteína IL-15 y al uso de tales constructos en vacunas y composiciones inmunomodulatorias. Varias realizaciones diferentes y formas son proporcionadas con respecto a éste aspecto. Generalmente, IL-15 se refiere a IL-15 humano. Sin embargo, los constructos también pueden referirse a IL-15 de otras especies tales como, por ejemplo, canina, felina, equina, bovina, porcina u ovina.

25

Este aspecto de la invención surge de la observación de que las secuencias en la proteína expresada por el mRNA de IL-15 nativo contiene señales o elementos que inhiben la expresión. Mediante la remoción de estos
5 elementos inhibitorios, se logra una expresión mejorada. En realizaciones preferidas, la secuencia que codifica el IL-15 está libre de la secuencia que codifica para el péptido de señal IL-15, y preferiblemente, otra proteína de señal, tal como la proteína de señal IgE se proporciona en su lugar. Además, la región Kozak IL-15 y las regiones no traducidas son removidas también para
10 eliminar elementos inhibitorios. Los únicos constructos de secuencias IL-15 incluidos preferiblemente son las secuencias IL-15 que codifican la secuencia de amino ácidos de la proteína IL-15 madura libre del péptido de señal IL-15.

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones
15 las cuales comprenden una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una proteína IL-15. En algunas realizaciones preferidas, una proteína de fusión consiste de una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una proteína IL-15. En algunas
20 realizaciones preferidas, la proteína IL-15 es libre de la secuencia de señal IL-15. En algunas realizaciones preferidas, la proteína de fusión es no-inmunogénica con respecto a las especies de las cuales se derivan las secuencias IL-15. Así, una proteína de fusión no-inmunogénica que comprende IL-15 humano sería no-inmunogénica en un humano.

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que incluyen un constructo el cual comprende secuencias codificantes para una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una proteína IL-15, también puede incluir sobre la misma molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico diferente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno. Generalmente, los inmunogenos, que son discutidos más adelante, pueden ser cualquier proteína inmunogénica que incluye alergenos, antígenos patógenos, antígenos asociados con cáncer o antígenos enlazados a células asociadas con enfermedades autoinmunes. En realizaciones preferidas, el inmunogeno es un antígeno patógeno, más preferiblemente un patógeno seleccionado del grupo que consiste de VIH, VSH, VCH y VNW.

En realizaciones preferidas, la composición además comprende una secuencia nucleotida que codifica CD40L. Esta secuencia nucleotida puede ser incluida sobre la misma molécula de ácido nucleico como la proteína de fusión o una molécula diferente. El CD40L puede ser incluido en composiciones de vacuna que incluyen secuencias que codifican para inmunogenos, produciendo vacunas mejoradas. En otras realizaciones, el CD40 L puede ser incluido en composiciones inmunomodulatorias que no incluyen secuencias codificantes para inmunogenos, produciendo composiciones inmunomodulatorias mejoradas.

En algunas realizaciones preferidas, los constructos de ácidos nucleicos son plásmidos. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido

nucleico es incorporada en un vector viral tal como vacunas, adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus, o cualquier otro vector viral aceptable útil como vacuna o vector de terapia de gen.

5 Los constructos genéticos comprenden secuencias nucleótidas que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal sin IL-15 enlazada a una proteína IL-15 que puede ser incorporada directamente dentro de patógenos vivos atenuados de acuerdo con algunos aspectos de la invención. Ejemplos de tales patógenos útiles como vacunas son señalados
10 más adelante. En realizaciones preferidas, IL-15 humana, preferiblemente libre de la secuencia de señal IL-15, está enlazada a la secuencia de señal IgE humana. En algunas realizaciones, tales patógenos atenuados son proporcionados además con una secuencia nucleótida que codifica CD40L.

15 Un aspecto de la invención es una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una secuencia de proteína IL-15. En algunas realizaciones preferidas, una proteína de fusión consiste de una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a proteína IL-15. En algunas realizaciones preferidas, la proteína IL-15 está libre de la secuencia de señal
20 IL-15. En algunas realizaciones preferidas, la secuencia de señal es una secuencia de señal IgE. Las secuencias son preferiblemente humanas. En algunas realizaciones preferidas, la proteína de fusión es no inmunogénica. No inmunogénica se refiere a la proteína que es no inmunogénica con respecto a las especies de las cuales se derivan las secuencias IL-15.

Composiciones que comprenden constructos genéticos que codifican IL-15 y CD40L y métodos para usar las mismas.

Otro aspecto general de la invención se relaciona con composiciones que comprenden constructos genéticos que codifican IL-15 y CD40L, y al uso de tales constructos en vacunas y composiciones inmunomodulatorias. Se proporcionan varias realizaciones y formas diferentes con respecto a éste aspecto. Generalmente, IL-15 se refiere a IL-15 humano. Sin embargo, los cosntructos también se pueden referir a IL-15 de otras especies tales como canina, felina, equina, bovina, porcina u ovina, por ejemplo. La IL-15 puede estar en la forma nativa, esto es, con la secuencia de señal IL-15. Preferiblemente, la IL-15 es parte de una proteína de fusión que incluye una secuencia de señal sin IL-15 y más preferiblemente está adicionalmente libre de la secuencia de señal IL-15. En realizaciones preferidas, la IL-15 está enlazada a una secuencia de señal IgE.

15

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 y CD40L o dos moléculas aisladas de ácido nucleico diferentes que incluye una primera que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 y una segunda que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CD40L. En algunas realizaciones preferidas, la proteína que comprende IL-15 es no inmunogénica con respecto a las especies de las cuales se derivan las secuencias IL-15.

20

De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que incluyen un constructo el cual comprende secuencias codificantes para IL-15 y CD40L también puede incluir sobre la misma molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico diferente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno. Generalmente, los inmunogenos, que son discutidos más adelante, pueden ser cualquier proteína inmunogénica que incluye alérgenos, antígenos patógenos, antígenos asociados con cáncer o antígenos enlazados a células asociadas con enfermedades autoinmunes. En realizaciones preferidas, el inmunogeno es un antígeno patógeno, más preferiblemente un patógeno seleccionado del grupo que consiste de VIH, VSH, VCH y VNW.

Las composiciones que incluyen secuencias codificantes para inmunogenos son útiles como vacunas. Las composiciones que no incluyen secuencias codificantes para inmunogenos pueden ser útiles como composiciones inmunomodulatorias. En algunas realizaciones, los inmunogenos de proteína son también proporcionados como un objetivo para la respuesta inmune realizada por la combinación IL-15 y CD40L.

En algunas realizaciones preferidas, los constructos de ácidos nucleicos son plásmidos. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico es incorporada en un vector viral tal como vacunas, adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus, o cualquier otro vector viral aceptable útil como vacuna o vector de terapia de gen.

Los constructos genéticos comprenden secuencias nucleótidas que codifican IL-15 y CD40L que pueden ser incorporadas directamente dentro de patógenos vivos atenuados de acuerdo con algunos aspectos de la invención. Ejemplos de tales patógenos útiles como vacunas son señalados más adelante. En realizaciones preferidas, IL-15 humano, preferiblemente libre de la secuencia de señal IL-15, está enlazada a la secuencia de señal IgE humano.

Vacunas y composiciones inmunomoduladoras

10

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención comprenden constructos genéticos que incluyen secuencias codificantes para inmunógenos y/o proteínas inmunogénicas. Tales composiciones son liberadas a un individuo para modular la actividad del sistema inmune de los individuos y por ende, mejorar la respuesta inmune contra el inmunógeno. Cuando las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína inmunomoduladora son captadas por células del individuo, las secuencias nucleótidas que codifican la proteína inmunomoduladora son expresadas en las células y, de aquí, las proteínas son liberadas al individuo. Aspectos de la invención proporcionan métodos para liberar las secuencias codificantes de las proteínas sobre una molécula de ácido nucleico simple, en composiciones que comprenden diferentes moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más de los varios factores de transcripción o factores intermediarios, como parte de vacunas recombinantes y como parte de vacunas atenuadas.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos los cuales inmunizan profilácticamente y/o terapéuticamente un individuo contra un patógeno o células anormales, relacionadas con enfermedades. La vacuna puede ser cualquier tipo de vacuna tal como, una vacuna viva atenuada, una vacuna de células, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o ADN.

La presente invención se relaciona con composiciones para liberar las proteínas inmunomodulantes y métodos para usar las mismas.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser liberadas mediante el empleo de cualquiera de varias tecnologías bien conocidas que incluyen inyección de ADN (también referida como vacunación de ADN), vectores recombinantes, tales como adenovirus recombinantes, virus asociados con adenovirus recombinantes y vacunas recombinantes.

Las vacunas de ADN son descritas en las patentes U.S. 5,593,972, 5,739,118, 5,817,637, 5,380,876, 5,926,428, 5,981,505, 5,580,859, 5,703,055, 5,676,594, y las solicitudes de prioridad citadas en el presente, las cuales son incorporadas como referencia. Adicionalmente a los protocolos de liberación descritos en aquellas solicitudes, métodos alternativos para la liberación de ADN son descritos en las Patentes US, No. 4,945,050 y 5,036,006, las cuales son incorporadas en la presente como referencia.

Las rutas de administración incluyen, pero no están limitadas a, intramuscular, intranasalmente, intraperitoneal, intradermal, subcutánea, intravenosa, intra-arterialmente, intraocularmente y oral como también topicamente, transdermalmente, mediante inhalación o supositorio, o tejido mucosal tales como, lavado a tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. Las rutas preferidas de administración incluyen inyección a tejido mucosal, intramuscular, intraperitoneal, intradermal y subcutáneo. Los constructos genéticos se pueden administrar por medios que incluyen, pero que no están limitados a, jeringas tradicionales, dispositivos de inyección con agujas, o "pistolas de microprojectiles de bombardeo de genes".

Cuando son captados por una célula, los constructos genéticos pueden permanecer presentes en la célula como una molécula de funcionamiento extra-cromosomal y/o integrado dentro del ADN cromosomal. El ADN puede ser introducido dentro de las células en las cuales permanece como un material genético separado en la forma de un plásmido o plásmidos. De manera alternativa, el ADN lineal que se puede integrar dentro del cromosoma puede ser introducido dentro de la célula. Cuando se introduce ADN dentro de la célula, se pueden adicionar los reactivos que promueven la integración de ADN dentro de los cromosomas. Las secuencias de ADN que son útiles para promover la integración también pueden ser incluidos en la molécula de ADN. De manera alternativa, el ARN puede ser administrado a la célula. También se contempla el proporcionar el constructo genético como un minicromosoma lineal que incluye un centromero, telómeros y un origen de replicación. Los constructos de genes pueden permanecer como parte del material genético en

microorganismos vivos atenuados o vectores microbiales recombinantes que viven en las células. Los constructos de genes pueden ser parte de genomas de vacunas virales recombinantes en los cuales el material genético ya sea que se integra dentro del cromosoma de la célula o permanece extracromosomal.

5 Los constructos genéticos incluyen elementos regulatorios necesarios para la expresión de genes de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codon de iniciación, un codón de detención, y una señal de poliadenilación. Adicionalmente, con frecuencia son requeridos
10 realzadores para la expresión del gen de la secuencia que codifica la proteína objetivo o la proteína inmunomodulante. es necesario que estos elementos sean enlazados de manera operable a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos regulatorios estén operablemente en el individuo a quien son administrados.

15 Los codones de iniciación y los codones de detención generalmente son considerados como parte de una secuencia nucleotida que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo a quien se administra el constructo de gen. Los codones de iniciación y terminación deben estar en con la secuencia de codificación.

20

Los promotores y las señales de poliadenilación empleados deben ser funcionales dentro de las células del individuo.

Ejemplos de promotores útiles en la práctica de la presente invención,
25 especialmente en la producción de una vacuna genática para humanos,

incluyen pero no están limitados a promotores de Simian Virus 40 (SV40), promotor de Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Virus de Inmunodeficiencia Humano (MV) tales como el promotor BIV Long Terminal Repeat (LTR), virus Moloney, ALV, Citomegalovirus (CMV) tal como el
5 promotor inicial inmediato CMV, Epstein Barr Virus (EBV), Rous Sarcoma Virus (RSV) como también promotores de genes humanos tales como Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotienina humana.

10 Ejemplos de señales de polieadenilación útiles para practicar la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para humanos, incluye pero no están limitados a señales de poliadenilación SV40 y
señales de poliadenilación LTR. En particular, se emplea la señal de poliadenilación SV40 que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego
15 CA), referida como la señal de poliadenilación SV40.

En adición a los elementos regulatorios requeridos para la expresión de ADN, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN. tales elementos adicionales incluyen realzadores. El realzador se puede seleccionar
20 del grupo que incluye, pero no está limitado a: Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, creatina muscular humana y realzadores virales tales como aquellos de CMV, RSV y EBV.

Los constructos genéticos se pueden proporcionar con origen de
25 replicación mamífero con el fin de mantener el constructo

extracromosomalmente y producir múltiples copias del constructo en la célula. Los plásmidos pVAX1, pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA) contienen el origen de replicación del virus Epstein Barr y la región codificante del antígeno nuclear que codifica EBNA-1 el cual produce alta replicación episomal de copias, sin integración.

En algunas realizaciones preferidas relacionadas con las aplicaciones de inmunización, son liberadas las moléculas de ácido nucleico, las cuales incluyen secuencias nucleótidas que codifican una proteína objetivo, la proteína inmunomodulante y, adicionalmente, genes para proteínas que además realzan la respuesta inmune contra tales proteínas objetivo. Ejemplos de tales genes son aquellos que codifican otras citoquinas y linfoquinas, tales como alfa-interferón, gama-interferón, factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), TNF, GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15, incluyendo IL-15 que tiene la secuencia de señal cancelada y opcionalmente incluye la secuencia de señal de IgE.

Un elemento adicional puede ser adicionado que sirva como un objetivo para la destrucción de células si es deseable eliminar células que reciben el constructo genético por cualquier razón. Un gen de herpes timidina quinasa (tk) en una forma expresable puede ser incluido en el constructo genético. El fármaco ganciclovir puede ser administrado al individuo y ese fármaco causará la muerte selectiva de cualquier célula que produce tk proporcionando, así, los medios para la destrucción selectiva de células con el constructo genético.

Con el fin de maximizar la producción de proteína, las secuencias reguladoras se pueden seleccionar de aquellas que son bien apropiadas para la expresión del gen en las células del constructo a ser administrado. Además, 5 los codones se pueden seleccionar de aquellos que son transcritos más eficientemente en la célula. Una persona versada en la materia puede producir constructos de ADN que sean funcionales en las células.

Un método de la presente invención comprende las etapas de 10 administrar moléculas de ácido nucleico intramuscularmente, intranasalmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intradermalmente o tópicamente o mediante lavado a tejido mucosal seleccionado del grupo que consiste de inhalación, vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual.

15 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es liberada a las células en conjunto con la administración de un realzador de la función polinucleotida o un agente facilitador de la vacuna genética. Los realzadores de la función polinucleotida son descritos en la Solicitud US número de serial 5,593,972, 5,962,428 y la Solicitud Internacional Número de Serial 20 PCT/US94/00899 presentada en Enero 26, 1994, las cuales son incorporadas en la presente como referencia. Los agentes facilitadores de vacunas genéticas son descritos en la US Número de Serial 021,579 presentada en Abril 1, 1994, la cual es incorporada en la presente como referencia. Los co- 25 agentes que son administrados en conjunto con moléculas de ácido nucleico se pueden administrar como una mezcla con la molécula de ácido nucleico o

administrados simultáneamente de manera separada, antes o después de la administración de las moléculas de ácido nucleico. Adicionalmente, otros agentes que pueden funcionar como agentes de transfección y/o agentes replicantes y/o agentes inflamatorios y los cuales se pueden co-administrar con un GVF incluyen factores de crecimiento, citoquinas y linfoquinas, tales como a-interferón, gama-interferón, GM-CSF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15, como también factores de crecimiento de fibroblastos, agentes de superficie activa, tales como complejos inmuno-estimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS que incluye monofosforil Lípido A (WL), péptidos de muramil, análogos de quinona y vesículas, tales como escualeno y escualeno, y ácido hialurónico también pueden ser empleados administrándolos en conjunto con el constructo genético. En algunas realizaciones, se puede emplear una proteína inmunomodulante como una GVF. En algunas realizaciones, se proporciona la molécula de ácido nucleico en asociación con PLG para realzar la liberación/recaptación.

Las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención comprenden aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 2000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención comprenden aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 1000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 10 nanogramos a aproximadamente 800

microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 0.1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 25 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN.

10

Las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención son formuladas de acuerdo con el modo de administración a ser empleado. En aquellos casos en los cuales las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, estas son estériles, libres de pirogéno y libres de partículas. Preferiblemente es empleada una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, las soluciones isotónicas tales como soluciones salinas amortiguadas con fosfato son preferidas. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se adiciona un agente de vasoconstricción a la formulación.

20

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, se proporcionan los métodos para inducir respuestas inmunes contra un inmunogeno mediante la liberación de las composiciones de la invención a un individuo. La vacuna

puede ser una vacuna viva atenuada, una vacuna celular, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o de ADN.

En adición al uso de formas expresables de una secuencia que codifica una proteína inmunomodulante para mejorar las vacunas genéticas, la presente invención se relaciona con vacunas vivas atenuadas mejoradas y vacunas mejoradas que emplean vectores recombinantes para liberar genes extraños que codifican antígenos. Ejemplos de vacunas vivas atenuadas y aquellas que emplean vectores recombinantes para liberar antígenos extraños son descritos en las patentes US Nos: 4,722,848; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424; 5,222,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; y 5,482,713, las cuales son incorporadas en la presente como referencia. Se proporcionan los constructos de genes que incluyen la secuencia nucleotida que codifica una proteína inmunomodulante está enlazada de manera operable a secuencias reguladoras que pueden funcionar en la vacuna para efectuar la expresión. Los constructos de gen son incorporados en las vacunas vivas atenuadas y las vacunas recombinantes para producir vacunas mejoradas de acuerdo con la invención.

20

La presente invención proporciona un método mejorado para inmunizar individuos, el cual comprende la etapa de liberar constructos del gen a las células de los individuos como parte de composiciones de vacuna las cuales incluyen vacunas de ADN, vacunas vivas atenuadas y vacunas recombinantes. Los constructos del gen comprenden una secuencia nucleotida que codifica

25

119

una proteína inmunomodulante y que está enlazada de manera operable a secuencias reguladoras que pueden funcionar en la vacuna para efectuar expresión. Las vacunas mejoradas resultan en una respuesta celular inmune mejorada.

5

Inmunogenos

La presente invención es útil para elicitare respuestas inmunes realizadas contra una proteína objetivo, esto es, proteínas asociadas específicamente con patógenos, alérgenos o las células "anormales" propias del individuo. La presente invención es útil para inmunizar individuos contra agentes patogénicos y organismos tales que una respuesta inmune contra una proteína patógena proporciona inmunidad protectora contra el patógeno. La presente invención es útil para combatir enfermedades y desórdenes hiperproliferativos, tales como cáncer, mediante la elicitación de una respuesta inmune contra una proteína objetivo que está asociada específicamente con las células hiperproliferativas. La presente invención es útil para combatir enfermedades y desórdenes autoinmunes mediante la elicitación de una respuesta inmune contra una proteína objetivo que está específicamente asociada con células involucradas en la condición autoinmune.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, el ADN o ARN que codifica una proteína objetivo y proteínas inmunomodulantes es introducido dentro de las células del tejido de un individuo en el cual es expresado, produciendo las proteínas codificadas. Las secuencias de ADN o

ARN que codifican la proteína objetivo y una o ambas de las proteínas inmunomodulantes están enlazadas a elementos reguladores necesarios para la expresión en las células del individuo. Los elementos reguladores para la expresión del ADN incluyen un promotor y una señal de adenilación.

- 5 Adicionalmente, también se pueden incluir otros elementos, tales como una región Kozak, en el constructo genético.

En algunas realizaciones, las formas expresables de secuencias que codifican la proteína objetivo y las formas expresables de secuencias que
10 codifican ambas proteínas inmunomodulantes son encontradas sobre la misma molécula de ácido nucleico que es liberada al individuo.

En algunas realizaciones, las formas expresables de secuencias que codifican la proteína objetivo ocurren sobre una molécula de ácido nucleico
15 separada de las moléculas de ácido nucleico que contienen formas expresables de secuencias que codifican una o más proteínas inmunomodulatorias. En algunas realizaciones, las formas expresables de secuencias que codifican la proteína objetivo y las formas expresables de secuencias que codifican una o más de las proteínas inmunomodulatorias
20 ocurren sobre una molécula de ácido nucleico que es separada de la molécula de ácido nucleico que contiene formas expresables de secuencias que codifican una o más de las proteínas inmunomodulantes. Se pueden producir y liberar múltiples moléculas de ácido nucleico diferentes de acuerdo con la presente invención y liberadas al individuo. Por ejemplo, en algunas
25 realizaciones, las formas expresables de secuencias que codifican la proteína

721

objetivo ocurren sobre una molécula de ácido nucleico separada de las moléculas de ácido nucleico que contienen formas expresables de secuencias que codifican una o más de las dos proteínas inmunomodulantes, las cuales ocurren sobre una molécula de ácido nucleico separada de las moléculas de ácido nucleico que contienen formas expresables de secuencias que codifican una o más proteínas inmunomodulantes. En tales casos, todas las tres moléculas son liberadas al individuo.

La(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden ser proporcionadas como ADN plásmido, las moléculas de ácido nucleico de vectores recombinantes o como parte del material genético proporcionados en una vacuna atenuada o vacuna celular. De manera alternativa, en algunas realizaciones, la proteína objetivo y/o marchita o ambas proteínas inmunomodulantes pueden ser liberadas como una proteína en adición a las moléculas de ácido nucleico que las codifican o en lugar de las moléculas de ácido nucleico que las codifican.

Los constructos genéticos pueden comprender una secuencia nucleotida que codifica una proteína objetivo o una proteína inmunomodulante enlazada de manera operable a elementos reguladores necesarios para la expresión del gen. De acuerdo con la invención, se proporcionan las combinaciones de constructos de genes que incluyen aquellos que comprenden una forma expresable de la secuencia nucleotida que codifica una proteína objetivo y aquellos que incluyen una forma expresable de la secuencia nucleotida que codifica una proteína inmunomodulante. La incorporación dentro de una célula viviente de la(s) molécula(s) de ADN o ARN que incluye la combinación de los

constructos de genes resulta en la expresión del ADN o ARN y la producción de la proteína objetivo y una o más proteínas inmunomodulantes. Resulta una respuesta inmune realizada contra la proteína objetivo.

5 La presente invención puede ser empleada para inmunizar un individuo contra todos los patógenos tales como virus, organismos procariotes y eucarioticos patogénicos, tales como organismo patogénicos unicelulares y parásitos multicelulares. la presente invención es particularmente útil para
10 inmunizar un individuo contra aquellos patógenos que infectan las células y los cuales no son encapsulados, tales como virus, y procariotes, tales como gonorrea, listeria y shigella. Adicionalmente, la presente invención también es útil para inmunizar un individuo contra patógenos protozoanos que incluyen un estado en el ciclo de vida en el cual son patógenos intracelulares. La tabla 1 proporciona un listado de algunas de las familias y géneros virales para los
15 cuales se pueden preparar las vacunas de acuerdo con la presente invención. Los constructos de ADN que comprenden secuencias de ADN que codifican los péptidos que comprenden al menos un epítopo idéntico o sustancialmente similar a un epítopo desplegado sobre un antígeno patógeno, tales como aquellos antígenos listados en las tablas, son útiles en las vacunas. Además,
20 la presente invención también es útil para inmunizar a un individuo contra otros patógenos que incluyen patógenos protozoanos procarioticos y eucarioticos como también parásitos multicelulares, tales como aquellos listados en la Tabla 2.

121

Con el fin de producir una vacuna genética para proteger contra la infección patógena, el material genético que codifica proteínas inmunogénicas contra las cuales se puede montar una respuesta inmune protectora se debe incluir en un constructo genético como la secuencia que codifica para la

5 objetivo. Sea que el patógeno infecte intracelularmente, para lo cual la presente invención es particularmente útil, o extracelularmente, es improbable que todos los antígenos patógenos elicitarán una respuesta protectora. Dado que el ADN y el ARN son ambos relativamente pequeños y se pueden producir relativamente de manera fácil, la presente invención proporciona la ventaja

10 adicional de permitir la vacunación con múltiples antígenos patógenos. El constructo genético empleado en la vacuna genética puede incluir material genético que codifica muchos antígenos patógenos. Por ejemplo, se pueden incluir varios genes virales en un constructo simple proporcionando así objetivos múltiples.

15

Las tablas 1 y 2 incluyen listas de algunos de los agentes y organismos patogénicos para los cuales se pueden preparar las vacunas genéticas para proteger un individuo de su infección. En algunas realizaciones preferidas, los métodos de inmunización de un individuo contra un patógeno están dirigidos

20 contra VIH, VSH, VCH, VNW o VBH.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para conferir una respuesta inmune protectora contra las células hiperproliferantes que son características en las enfermedades hiperproliferativas y a un método

25 para el tratamiento de individuos que sufren de enfermedades

A24

hiperproliferativas. Ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen todas las formas de cáncer y psoriasis.

Se ha descubierto que la introducción de un constructo genético que incluye una secuencia nucleotida que codifica una proteína inmunogénica asociada a "células hiperproliferantes" dentro de las células de un individuo resulta en la producción de aquellas proteínas en las células vacunadas de un individuo. Para inmunizar contra enfermedades hiperproliferativas, un constructo genético que incluye una secuencia nucleotida que codifica una proteína que está asociada con una enfermedad hiperproliferativa es administrado a un individuo.

Con el fin de que la proteína asociada-hiperproliferativa sea un objetivo inmunogénico efectivo, esta debe ser una proteína que sea producida exclusivamente o en niveles altos en células hiperproliferativas en comparación con las células normales. Los antígenos objetivo incluyen tales proteínas, fragmentos de las mismas y péptidos, los cuales comprenden al menos un epítopo encontrado sobre tales proteínas. En algunos casos, una proteína asociada hiperproliferativa es el producto de una mutación de un gen que codifica una proteína. El gen mutado codifica una proteína que es casi idéntica a la proteína normal excepto que tiene una secuencia amino ácida levemente diferente lo cual resulta en un epítopo diferente no encontrado en la proteína normal. Tales proteínas objetivo incluyen aquellas que son proteínas codificadas por oncogenes tales como *myb*, *myc*, *fyn*, y el gen de translocación *bcr/abl*, *ras*, *src*, P53, *neu*, *trk* y EGRF. Adicionalmente a los productos de

oncogenes como antígenos objetivo, las proteínas objetivo para los tratamientos anti-cáncer y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos preparados por linfomas de células B y regiones variables de receptores de células T de linfomas de células T los cuales, en algunas realizaciones, también son empleados antígenos objetivo para enfermedades auto-inmunes. Otras proteínas asociadas a tumores pueden ser empleadas como proteínas objetivo tales como proteínas que son encontradas a niveles superiores en células tumorales que incluyen la proteína reconocida como anticuerpo monoclonal 17-1A y proteínas de ligamiento a folato o PSA.

10

Mientras la presente invención se puede emplear para inmunizar un individuo contra una o más de varias formas de cáncer, la presente invención es particularmente útil para inmunizar profilácticamente un individuo que está predispuesto a desarrollar un cáncer particular o que ha tenido cáncer y es por ende susceptible a una recaída. Los desarrollos en genética y la tecnología como también en la epidemiología permiten la determinación de probabilidad y evaluación del riesgo del desarrollo de cáncer en el individuo. Empleando barrido genético y/o antecedentes familiares de salud, es posible predecir la probabilidad que tiene un individuo particular para desarrollar cualquiera de los varios tipos de cáncer.

20

De manera similar, aquellos individuos que han desarrollado cáncer y que han sido tratados para remover el cáncer o están de otra manera en remisión son particularmente susceptibles a recaídas y re-ocurrencias. Como parte de un régimen de tratamiento, tales individuos pueden ser inmunizados

25

contra el cáncer que se les ha diagnosticado que tienen con el fin de combatir una recurrencia. Así, una vez es sabido que un individuo ha tenido un tipo de cáncer y está en riesgo de una recaída, ellos pueden ser inmunizados con el fin de preparar su sistema inmune para combatir cualquier aparición futura del

5 cáncer

La presente invención proporciona un método para tratar individuos que sufren de enfermedades hiperproliferativas. En tales métodos, la introducción de constructos genéticos sirve como un inmunoterapéutico, dirigiendo y

10 promoviendo el sistema inmune del individuo a combatir las células hiperproliferativas que producen la proteína objetivo.

La presente invención proporciona un método para tratar individuos que sufren de enfermedades y desórdenes autoinmunes mediante el conferimiento

15 de una amplia respuesta inmune protectora contra objetivos que están asociados con autoinmunidad incluyendo receptores de células y células que producen anticuerpos "auto"- dirigidos.

Las enfermedades autoinmunes mediadas por células T incluyen Artritis

20 reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), síndrome de Sjogren, sarcoidosis, diabetes mellitas dependiente de insulina (IDDM), tiroiditis autoinmune, artritis reactiva, espondiolitis anquilosante, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Cada una de estas enfermedades está caracterizada por receptores

25 de células T que enlazan a antígenos endógenos e inician la cascada de

inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunes. La vacunación contra la región variable de las células T elicitaría una respuesta inmune que incluye CTLs para eliminar aquellas células T.

5 En la RA, se han caracterizado varias regiones variables específicas de los receptores de las células T (TCRs) que están involucradas en la enfermedad. Estas TCRs incluyen V β -3, V β -14,20 V β -17 y V α -17. Así, la vacunación con un constructo de ADN que codifica al menos una de estas proteínas elicitará una respuesta inmune que marcará células T involucradas

10 en la RA. Ver: Howell, M.D., *et al*, 1991 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:10921-10925; Piliard, X., *et al*, 1991 *Science* 253:325-329; Williams, W.V., *et al.*, 1992 *J Clin. Inves.* 90:326-333; cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia. En la MS, han sido caracterizadas varias regiones variables específicas de TCRs que están involucradas en la enfermedad. Estos TCRs

15 incluyen V β y V α -10. Así, la vacunación con un constructo de ADN que codifica al menos una de estas proteínas elicitará una respuesta inmune que marcará células T involucradas en la MS. Ver: Wucherpfennig, K.W., *et al*, 1990 *Science* 248:1016-1019; Oksenberg, J.R., *et al*, 1990 *Nature* 345:344-346; cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia.

20

En escleroderma, se han caracterizado varias regiones variables específicas de TCRs que están involucradas en la enfermedad. Estas TCRs incluyen V β -6, V β -8, V β -14, y V α -16, V α -3C, V α -7, V α -14, V α -15, V α -16, V α -28 y V α -12. Así, la vacunación con un constructo de ADN que codifica al menos

una de estas proteínas elicitará una respuesta inmune que marcará células T involucradas en escleroderma.

Con el fin de tratar pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune
5 mediada por célula T, particularmente aquellos para los cuales la región variable del TCR ha sido caracterizada, se puede llevar a cabo una biopsia sinovial. Las muestras de las células T presentes se pueden tomar y la región variable de aquellas TCRs son identificadas empleando técnicas patrón. Las vacunas genéticas se pueden preparar empleando esta información.

10

Las enfermedades autoinmunes mediadas por célula B incluyen Lupus (SLE, enfermedad de Grave, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, asma, crioglobulinemia, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por
15 anticuerpos que enlazan antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunes. La vacunación contra la región variable de los anticuerpos elicitaría una respuesta inmune que incluye CTLs para eliminar aquellas células B que producen el anticuerpo.

20

Con el fin de tratar pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune mediada por célula B, se debe identificar la región variable de los anticuerpos involucrados en la actividad autoinmune. Se puede llevar a cabo una biopsia y se pueden tomar las muestras de los anticuerpos presentes en un sitio de la inflamación. La región variable de aquellos anticuerpos se puede identificar

empleando técnicas patrón. Las vacunas genéticas se pueden preparar empleando esta información.

En el caso del SLE, se cree que un antígeno es el ADN. Así, en los
5 pacientes que son inmunizados contra SLE, su suero puede ser barrido para anticuerpos anti-ADN y se puede preparar una vacuna que incluya constructor de ADN que codifican la región variable de tales anticuerpos anti-ADN encontrados en el suero.

10 Las características estructurales comunes entre las regiones variables tanto de TCRs y anticuerpos son bien conocidas. La secuencia de ADN que codifica un TCR particular o un anticuerpo se puede encontrar generalmente siguiendo métodos bien conocidos tales como aquellos descritos en Rabat, et
al 1987 Sequence of Proteins of Immunological Interest U.S Department of
15 Health and Human Services, Bethesda MD, la cual se incorpora en la presente como referencia. Adicionalmente, un método general para la clonación funcional de regiones variables de anticuerpos se pueden encontrar en Chaudhary, V.K., et al. 1990 *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 87:1066, el cual es incorporado en la presente como referencia.

20

Producción de proteínas recombinantes

La presente invención se relaciona con cultivos in vitro de células huésped que comprende vectores de expresión operable en tales células
25 huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica

proteínas de fusión que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE; a tales moléculas de ácido nucleico; y a células huésped que comprenden tales vectores. La presente invención además se relaciona a métodos para producir una proteína de fusión que comprende la

5 etapa de cultivar la célula huésped. La presente invención se relaciona con proteínas de fusión aisladas que comprende un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE.

Las proteínas de fusión se pueden producir mediante medios rutinarios

10 empleando materiales de partida disponibles fácilmente como se describió anteriormente. La provisión de una secuencia de ADN adecuada que codifica la proteína deseada permite la producción de la proteína empleando técnicas recombinantes conocidas ahora en la técnica.

15 Una persona versada en la materia puede, empleando técnicas bien conocidas, insertar ADN que codifica una proteína de fusión dentro de un vector de expresión disponible comercialmente para su empleo en sistemas de expresión bien conocidos. El plásmido pYES2 disponible comercialmente (Onvitrogen, San Diego, Calif) puede ser empleado para la producción en

20 cepas de levaduras *S. cerevisiae*. El sistema de expresión baculovirus completo MaxBac™ disponible comercialmente (Invitrogen, San Diego, Calif) puede ser empleado para la producción en células de insectos. El plásmido pcADN I disponible comercialmente (Invitrogen, San Diego, Calif) puede ser empleado para la producción en células de mamíferos, tales como células de

25 Ovario de hamster Chino. Una persona versada en la materia puede emplear

estos sistemas comerciales de vectores de expresión u otros para producir proteína de fusión empleando técnicas rutinarias y materiales de partida fácilmente disponibles.

5 Una persona versada en la materia puede emplear otros vectores y sistemas de expresión disponibles comercialmente o producir vectores empleando métodos bien conocidos y materiales de partida fácilmente disponibles. Los sistemas de expresión que contienen las secuencias de control requisito, tales como promotores y señales de poliadenilación, y
10 preferiblemente realizadores, están disponibles y son conocidos en la técnica para una variedad de huéspedes. Ver, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Así, se pueden preparar las proteínas deseadas en ambos sistemas procarióticos y eucarióticos, resultando en un espectro de formas procesadas
15 de la proteína.

Una amplia variedad de huéspedes eucarióticos también están disponibles para la producción de proteínas extrañas recombinantes. Los huéspedes eucarióticos se pueden transformar con vectores de expresión que
20 producen la proteína deseada directamente empleando el péptido de señal IgE.

Los sistemas eucarióticos comúnmente empleados incluyen, pero no están limitados a, levaduras, células fúngicas, células de insectos, células mamíferas, células aviares, y células de plantas superiores. Los promotores
25 adecuados están disponibles, los cuales son compatibles y operables para su

uso en cada uno de estos tipos de huéspedes como también lo están las secuencias de terminación y los realizadores, como por ejemplo, el promotor baculovirus polihedron. Como lo anterior, los promotores pueden ser ya sea constitutivos o inducibles. Por ejemplo, en sistemas de mamíferos, el promotor de metalotioneno de ratón puede ser inducido por la adición de iones de metales pesados.

Los particulares para la construcción de los sistemas de expresión adecuados para huéspedes son conocidos por aquellos en la técnica. Para la producción recombinante de la proteína, el ADN que la codifica es ligado de manera adecuada dentro del vector de expresión de elección, y posteriormente empleado para transformar el huésped compatible que es posteriormente cultivado y mantenido bajo condiciones en las cuales tiene lugar la expresión del gen extraño. La proteína de la presente invención producida de esta manera es recuperada del cultivo, ya sea mediante lisis de las células o preferiblemente del medio de cultivo como sea apropiado y conocido por aquellos de la técnica.

Una persona versada en la materia puede, empleando técnicas bien conocidas, aislar la proteína del receptor de fusión o fragmentos de la misma producida empleando tales sistemas de expresión.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

INTRODUCCIÓN

El éxito de la combinación de la terapia antiretroviral, para reducir la
5 carga viral en sujetos infectados resulto en prognosis mejorada para muchos
individuos positivos con VIH-1. Sin embargo, un número de laboratorios ha
reportado que el reservorio viral es impactado de manera pobre por los
regímenes de combinación de fármacos (Referencias 1-3 abajo). A la fecha la
aproximación a la terapia de no combinación ha resultado en transparencia
10 viral y existen significativos efectos secundarios asociados con los actuales
regímenes terapéuticos que finalmente afectan el cumplimiento del paciente e
impactan el curso de la enfermedad. Por lo tanto, existe una gran necesidad
por explorar formas alternativas de terapia que incluyen aproximaciones
inmunoterapéuticas potenciales para VIH-1. Se cree que las respuestas de las
15 células T CD8+ son importantes para controlar la infección por VIH-1 y en la
reducción del progreso de la enfermedad. Aunque la función exacta de las
respuestas de las células T CD8+ específicas de VIH-1 en el control de la
replicación viral no han sido completamente elucidados, se ha establecido una
correlación entre la progresión a largo plazo en individuos seropositivos para
20 VIH-1 y respuestas celulares específicas mediadas por células T CD8+
(referencias 4-7 abajo). Adicionalmente, un cohorte de individuos altamente
expuestos, pero negativos de VIH en Gambia no han demostrado respuestas a
anticuerpos, más aún han demostrado respuestas inmunes a células T CD8+
anti-VIH-1 (Referencias 8 y 9 abajo). De hecho, después de la infección con
25 VIH-1 se indujo una fuerte respuesta inmune celular con una concurrente caída

en la carga viral. Más aún, a pesar de la presencia de altos niveles de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de VIH, no se aclaró la infección por VIH-1. Esta discrepancia entre una alta respuesta mediada por CD8 y la progresión continuada de la enfermedad es de interés. La incapacidad de las CTLs para
5 limpiar los virus puede ser debido en parte a los mutantes de escape de CTL (referencias 10-14 abajo), posiblemente inmunopatogénesis de los virus, tales como la regulación descendiente asociada a Nef de MHC Clase I o Vpr o efectos de env sobre la inmunidad del huésped (referencias 15-18 abajo). Un aspecto adicional es la carencia de un auxiliar efectivo de célula T CD4 para los
10 linfocitos T CD8+ (Referencias 19 y 20 abajo). Se ha observado que las células circulantes CD8+ pueden haber dañado la función (referencia 21 abajo). Si la inmunopatogénesis de VIH-1 limita el desarrollo de una respuesta efectiva de CD8, entonces la presentación de antígenos de VIH-1 dentro del contexto de la terapia anti-retroviral podría impulsar las células efectoras y de la
15 memoria CD8 de manera limitada. Estos eventos podrían tener un impacto potencial sobre la enfermedad resultante. Sin embargo, esto puede ser importante para proporcionar asistencia para la expansión de la célula T CD8+. Sobre este particular, se encontró que la supervivencia de las células T de la memoria CD8+ no estaban contingentes sobre la presentación continuada del
20 antígeno, (Referencia 22 abajo) pero puede ser más dependiente de la producción de citoquinas específicas en el ambiente periférico.

Una de tales citoquinas que parece impactar significativamente las células T CD8+ es la interleuquina-15 (IL-15). Waldmann y colegas reportaron
25 primero que la IL-15 es una proteína de 15 kDa que emplea las cadenas gamma

y beta del complejo receptor IL-2 en concierto con una única cadena alfa para las células T de señal (Referencia 23 abajo). La IL-15 manifiesta actividad anti-apoptótica y parece jugar un papel en la estimulación de un fenotipo de la célula T de la memoria CD8+. El papel que juega la IL-15 en la infección del VIH-1 está siendo investigado por un número de grupos. Se ha demostrado que la IL-15 reduce la apoptosis de linfocitos aislados de sujetos infectados con VIH-1 (Referencia 24 abajo) e incrementa la actividad y proliferación de células destructoras naturales, (referencias 25-27 abajo). La IL-15 también está implicada en la proliferación de células B (referencias 28 y 29 abajo) de sujetos infectados con VIH-1 y la activación de macrófagos (referencia 30 abajo). de manera importante, la IL-15 también parece tener un papel directo sobre la proliferación de la célula T efectora del VIH-1 y la producción del interferón-gama (IFN-gama) (Referencias 31 y 32 abajo). Más aún, la IL-15, no era capaz de estimular IFN-gama en muchos sujetos evaluados quienes eran seropositivos para VIH-1. Los efectos de la IL-15 sobre las respuestas inmunes celulares T del antígeno específico CD8+ fueron por ende exploradas.

Se examinaron los efectos de IL-15 sobre las células T aisladas de sujetos seropositivos infectados crónicamente con VIH-1. Se encontró que rIL-15 realza la proliferación de células T CD8, y de manera importante, la IL-15 expandió la producción efectora de IFN-gama del antígeno específico CD8+ en todos los sujetos. En un modelo de inmunización la IL-15 impulsó la función efectora de CD8+, la cual fue explorada en un sistema de modelo de inmunización. Los linfocitos CD8+ de ratones fueron capaces de lisar objetivos que expresan antígenos de VIH-1 a un nivel más alto cuando la IL-15 era

proporciona en *trans*. Este efecto ocurrió en la ausencia de proliferación fuerte de células T CD4+. Sin embargo, en los ratones bloqueados (KO) con CD4, la IL-15 no podría evitar completamente el requerimiento para el auxiliar CD4 en la generación de la respuesta efectora de CD8. Estos resultados sugieren que la IL-15 es altamente efectiva en la expansión de las células de la memoria CD8, pero la IL-15 sola no es suficiente para su generación inicial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo ELISPOT sobre PBMCs humano

Se evaluaron los PBMCs aislados de voluntarios VIH-1 positivos mediante la técnica básica de ficoll-hypaque para la función efectora mediante un ensayo ELISPOT patrón. Los PBMCs fueron resuspendidos en RPMI con FCS al 10% (R10) a una concentración de 1×10^6 células/ml. El anticuerpo 1-DIK (Mabtech, Mariemont OH; Nacka, SE) fue diluido hasta 15 µg/ml en una solución carbonato-bicarbonato 0.1M (pH9.6) y se empleo para revestir placas de 96 pozos con membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Las placas fueron incubadas a 4°C durante toda la noche. las placas fueron lavadas 6 veces con 200µl de PBS. Se preparo una mezcla de 122 péptidos estériles como un cóctel a una concentración (por cada péptido) de 50µg/ml en DMSO. Los péptidos son una serie de péptidos en superposición, de 15 amino ácidos de longitud, que abarcan todos los Gag VIH-1 (Repositorio de Referencia Y Reactivos, ARRR). Se adicionaron 100,000 PBMCs a cada pozo (100 µl a 1.0×10^6 células/ml) de las placas recubiertas con el anticuerpo de nitrocelulosa, junto con 100µl del cóctel de péptidos diluido 1:200 en R10 con o sin 50 ng/ml de IL-15 (concentración final 25 ng/ml). Cada muestra se ensayo

por triplicado. Se empleo PHA a 5µg/ml como un control positivo. las placas fueron incubadas a 37°C durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente las placas fueron lavadas 6 veces con 200µl de PBS. Se adicionó 100 µl del anticuerpo 7-B6-1-Biotina (mabtech) a cada pozo a una concentración de 1µg/ml en PBS. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Las placas fueron lavadas 6 veces con 200 µl de PBS. Se adicionaron 100 µl de solución de sustrato (BCIP/NBT, Sigma) a cada pozo. La solución en desarrollo fue removida con agua de extracción. Los Dynabeads (DynaL Biotech, Lake success, NY; Oslo, NO) acoplado a anticuerpo monoclonal específico para cualquiera de CD7 o CD4 fueron empleados para agotar las poblaciones de CD8 y CD4.

Co-estimulación de PBMCs con anticuerpo monoclonal a CD3

Los PBMCs aislados de sujetos seropositivos para VIH-1 fueron estimulados con anticuerpo monoclonal específico para CD3 enlazada para Dynabeads (DynaL Biotech) con o sin IL-15 (50 ng/ml) y se analizo para la producción de IFN-gama mediante ELISPOT, como se describió anteriormente. Los Dynabeads (DynaL Biotech)acoplados a anticuerpos específicos para cualquiera de CD8 o CD4 fueron empleados para agotar las poblaciones de CD8 y CD4.

Co-estimulación de PBMCs con CD40L

La proteína CD40L fue evaluada en combinación con IL-15 y la mezcla de péptidos a una concentración de 250µg/ml y se analizo para la producción de IFN-gama mediante ELISPOT como se describió anteriormente.

Inmunización de plásmido en ratones

Los ratones Balb/c hembras fueron co-vacunados en las semanas 0 y 2 con 50 µg de pCgag o pCenv y 50 µg del plásmido que expresa genes de citoquina Th1 IL-15 dependiente de IL-2R como se describió anteriormente (Referencias 33 abajo). Los ratones homocigóticos para la mutación marcada Cd4^{tm1Kny} también fueron empleados. Los ratones tienen un bloque completo en el desarrollo de célula T CD4+ debido a una mutación en el gen CD4; 90% de sus células T circulantes son CD8+. Los ratones mutantes homocigóticos también muestran un déficit restringido de Clase II en la actividad de la célula T auxiliar y otras respuestas de células T. B6.129S6-Cd4^{tm1Kny} fueron co-vacunados en las semanas 0 y 2 con 50 µg de pCgag y 50 µg de plásmidos que expresan CD40L, IL-15 o ambos en combinación. Todo el ADN fue preparado empleando columnas Qiagen y formulaciones finales fueron bupivacaina al 0.25% es amortiguador de citrato isotónico. Los esplenos fueron sembrados una semana después de la segunda inyección.

Ensayo de linfocito T citotóxico en murina

La respuesta CTL fue evaluada en un ensayo CTL de liberación de ¹⁵Cr de cinco horas empleando células infectadas con vacunas recombinantes como objetivos. Los esplenocitos fueron aislados una semana después de la vacunación y se estimulo *in vitro*. Los efectores fueron estimulados con células relevantes infectadas con vacunas. P815 fueron infectados con vDK1 para gag/pol, (ARRR) o vMN462 (ARRR) para env. Los estimuladores fueron fijados con glutaraldehído al 0.1% como se describió previamente y se incubaron con los esplenocitos en una proporción de 1:20 por cuatro a cinco días en un medio

de cultivo CTL. El medio de cultivo CTL consistía de una proporción 1:1 de medio Dulbecco Modificado de Iscove (Gibco—BRL, Grand island, NY) y la Solución Salina Balanceada de Hank (Gibco-BRL) con suero fetal de ternero 1640 al 10%(Gibco-BRL) y RAT-T-STIM sin Con A (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Los objetivos infectados con vacunas fueron preparados infectando 3×10^6 células P815 en una multiplicidad de infección (MOI) de 10 durante doce horas a 37°C. Se realizó un ensayo de liberación de Cromo en el cual las células objetivo fueron marcadas con 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\text{Na}^{251}\text{CrO}_4$ durante 120 minutos y se incubaron con los esplenocitos efectores estimulados durante seis horas a 37°C. La lisis de CTL se determinó en las proporciones efector:objetivo (E:T) en el rango de 50:1 a 12.5:1. los sobrenadantes fueron sembrados y contados sobre un contador-gama LKB ClineGamma. El porcentaje de lisis específica se determinó a partir de la fórmula:

$$100 \times \frac{\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}}$$

Se determinó la liberación máxima mediante la lisis de células objetivo en un medio que contiene Triton X-100 al 1%. No se consideraba un ensayo válido si el valor para las cuentas de "liberación espontánea estaba en un exceso del 20% de la "liberación máxima".

Lisis complementaria de células T CD8+

Las células T CD8+ fueron removidas de los esplenocitos mediante un tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CD8 (pharmingen, San Diego, CA)

seguido por incubación con complemento de conejo (Sigma) durante 45 min, a 37°C como se describió (Referencia 33 abajo).

Ensayo de proliferación de célula auxiliar T murina

5 Se empleo un ensayo de proliferación de linfocitos para evaluar la inmunocompetencia total de los linfocitos y detectar células divisoras específicas de antígeno. Los linfocitos fueron sembrados de espiens y se prepararon mediante la remoción de los eritrocitos y lavando varias veces con medio fresco como se describió (Referencia 34 abajo). Las células aisladas
10 fueron resuspendidas a una concentración de 5×10^6 células/ml. Se adicionó inmediatamente una alícuota de 100 μ l que contiene 5×10^5 células a cada pozo de una placa de fondo plano de microtitulación de 96 pozos. La proteína recombinante p24 fue adicionada a los pozos por triplicado resultando en la concentración final de 5 μ g/ml y 1 μ g/ml. Las células fueron incubadas a 37°C
15 en CO₂ al 5% durante tres días. Se adicionó un μ Ci de timidina titulada a cada pozo y las células se incubaron durante 12 a 18 horas a 37°C. Las placas fueron sembradas y se midió la cantidad de timidina titulada incorporada en un lector Beta Plate (Wallac, Turku, Finlandia). El índice de estimulación se determinó a partir de la fórmula:

20 *Índice de Estimulación (SI) = (cuenta experimental/cuenta espontánea)*

 Los pozos con cuentas espontáneas incluían suero fetal de ternero al 10%, lo cual servirá como control de proteína irrelevante. De manera similar, los esplenocitos de pCgag o ratones de control inmunizados rutinariamente
25 tienen un SI de 1 contra su proteína objetivo irrelevante. Para asegurar que las

células son saludables, se empleo PHA o Con A (Sigma) como un control policlonal estimulador positivo.

Análisis de Citoquina y Quimoquina de células murina estimuladas

5 Los linfocitos fueron sembrados de esplens y las células aisladas fueron resuspendidas a una concentración de 5×10^6 células /ml. Se adiciono una alícuota de 100µl que contiene 5×10^5 células a cada pozo de una placa de fondo plano de microtitulación de 96 pozos. La proteína recombinante p24 o de envoltura fue adicionada a los pozos por triplicado resultando en

10 concentraciones finales de 5µg/ml y 1 µg/ml. Las células fueron incubadas a 37°C en CO₂ al 5% durante tres días y se sembraron los sobrenadantes. Las citoquinas y las quimoquinas se midieron con kits ELISA disponibles comercialmente.

15 Tinción Intracelular para el Interferón-γ de células murinas estimuladas

A los ratones les fueron proporcionadas dos inyecciones con alguno del plásmido pCgag ADN o plásmido pCgag ADN más pIL-15. Una semana después, los esplenocitos fueron sembrados y cultivados *in vitro* durante cinco horas en un medio que contiene un cóctel del péptido p55 (que contienen 122

20 15meros de empalme p55 VIH-1 con superposiciones de 11 aa) y Brefeldin A. Después de la estimulación, las células fueron teñidas extracelularmente con anticuerpos anti-ratón CD3 y anti-ratón CD8 y posteriormente intracelularmente con anti-ratón IFN-γ. Las curvas de puntos representan respuestas de linfocitos CD3+/CD8+.

Mapeo del epítopo

Los esplenocitos fueron resuspendidos en RPMI con FCS al 10% (R10) a una concentración de 1×10^6 células/ml. La serie de 122 péptidos obtenidos del Repositorio de reactivos y referencia fueron mezclados como conjuntos de 10 péptidos por conjunto a una concentración final de 20 μg /péptido. Cada péptido fue incluido en dos conjuntos distintos para un total de 22 conjuntos de péptidos. Los conjuntos fueron dispuestos en un formato de matriz y se emplearon para la estimulación del esplenocito. Se evaluó la producción de IFN-gama mediante ELISPOT (Sistemas R y D). Las placas fueron incubadas a 37°C por aproximadamente 24 horas. Cada muestra se ensayo por triplicado.

RESULTADOS

Estimulación de linfocitos con CD3 e IL-15

El IL-15 fue evaluado por su capacidad para aumentar la activación efectora de la célula T, de manera sinérgica, con la estimulación del receptor de la célula T. Los PBMCs fueron aislados de individuos infectados con VIH-1. Los PBMCs fueron estimulados con anticuerpos enlazados a la superficie para CD3 y posteriormente incubados durante toda la noche con IL-15. Como era de esperarse, la sola estimulación de CD3 de los PBMCs indujo la producción de IFN- γ , mientras que el suplemento IL-15 solo indujo poco a nada de respuesta. Sin embargo, se observó un incremento de varias veces en el número de células que secretan IFN- γ cuando los linfocitos fueron estimulados con CD3 e IL-15 en conjunto (Figura 1). Las poblaciones estimuladas fueron agotadas de células CD4+ o CD8+ y posteriormente suplementadas con IL-15

y de nuevo se probó su actividad. Nuevamente, la pérdida de las células CD8 agotó la activación de señal. Los datos indican que las células T efectoras CD8+ de individuos crónicamente infectados con VIH-1 pueden ser expandidas mediante la estimulación con IL-15/CD3 (Figura 2).

5

Producción de IFN- γ de Antígeno específico de muestras positivas de VIH-1 después de la estimulación con IL-15

Se evaluó *in vitro* la capacidad del IL-15 para realzar una respuesta de CD8+ del antígeno específico VIH-1. Las muestras fueron recogidas de sujetos infectados crónicamente con VIH-1+ quienes estaban siendo tratados con terapia de combinación antiretroviral (HAART). Los PBMCs fueron evaluados por su capacidad para secretar IFN-gama después de la estimulación con péptidos específicos VIH-1 en presencia o ausencia de IL-15. Los PBMCs fueron estimulados con péptidos de 15 amino ácidos en superposición de VIH-1 que abarcaban toda la región de lectura abierta de la proteína gag VIH-1. Los PBMCs de los sujetos estimulados con péptidos exhibieron una producción expandida de IFN-gama cuando se trataron con IL-15 (Figuras 3A y 3B) y existió una diferencia significativa entre la producción del IFN-gama con y sin IL-15 ($p=.009$), (Figura 3C). Algunos sujetos tenían altos niveles de secreción de IFN-gama con la sola estimulación de IL-15 (Figura 3A), sugiriendo que ellos tenían activación parcial de las células T que fueron bloqueadas y requerían de suplemento de citoquina para ser efectivas. Esta actividad estaba claramente mediada por CD8 dado que la producción de IFN-gama estaba perdida cuando la población de células CD8 estaba agotada (Figura 3D).

25

IL-15 realiza la respuesta de CD8+ CTL en ratones *in vivo*.

Los anteriores estudios de respuestas de VIH-1 e IL-15 establecieron que el IL-15 podría realzar la producción de IFN-gama en poblaciones de células T iniciadas. Sin embargo, no era claro que efecto tendría el IL-15 sobre la inducción funcional de las células T CD8+ *in vivo*. Para responder este cuestionamiento se empleo un sistema de modelo de ratón. Los ratones fueron vacunados con plásmidos de VIH-1 como medios para liberar los antígenos de VIH-1 y estudiar la inducción de la inmunidad de CD8 *in vivo*. Los plásmidos que expresan VIH-1 fueron co-inyectados con un plásmido que expresara IL-15, o un plásmido control, y se compararon las respuestas inmunes resultantes. En los ensayos voluminosos de CTL, la co-inyección con plásmidos que expresan envoltura de VIH-1 e IL-15 resultaron en aproximadamente 40% de lisis de los objetivos que expresan envoltura de VIH-1 en una proporción efector:objetivo de 50 : 1 comparado con el 11% de lisis observado con el plásmido de envoltura y el vector de control (Figura 4, panel A). Estos resultados eran dependientes de célula T CD8 e indican un efecto significativo de IL-15 sobre el efector de respuesta de la célula T.

IL-15 induce la secreción de MIP-1 β e IFN-g después de la estimulación con antígeno en ratones

Las respuestas inmunes celulares inducidas por vacunas fueron adicionalmente extendidas examinando los perfiles de expresión de la β -quimoquina MIP-1 β como un marcador de la activación inmune. Las quimoquinas son moduladores importantes de respuestas inmunes e inflamatorias. Ellas son de especial importancia en la regulación molecular de

la circulación de leucocitos de las vesículas hacia los sitios periféricos de la defensa del huésped. Además, previamente se ha reportado que las quimoquinas producidas por células T que incluyen MIP-1 β juegan un papel crítico en la expansión inmune celular (Referencia 24 abajo). Por lo tanto, el nivel de quimoquinas producido por células T estimuladas, pueden proporcionar una visión adicional acerca del nivel y la calidad de la respuesta inmune celular de antígeno específico. Se analizó y probó el sobrenadante de las células T estimuladas (como se describió en Materiales y Métodos) para la liberación de MIP-1 β . La co-inmunización con IL-15 resultó en niveles de secreción de MIP-1 β altos (Figura 4, panel B).

Los sobrenadantes fueron evaluados además para la producción de la citoquina Th1, IFN- γ . Se obtuvieron las muestras justo antes de que las células fueran empeladas en el ensayo de CTL después de una estimulación con linfocitos de 3 días con un estimulador de células infectado con vacuna recombinante que expresa envoltura de VIH-1. La Figura 4, panel C nota que los esplenocitos de ratones co-inyectados con IL-15 indujo altos niveles de IFN- γ (120 pg/ml) en comparación con aquellos inyectados con la vacuna plásmido solamente o el control. Por el contrario, no se observó en estos estudios una producción significativa de IL-14 por cualquier cultivo (datos no mostrados).

Tinción Intracelular para IFN- γ y TNF- α

Para cuantificar la respuesta de la célula T a las vacunas de VIH-1, se llevaron a cabo ensayos de tinción intracelular de citoquina. Los animales inmunizados fueron sacrificados y los esplenocitos fueron sembrados y

cultivados in vitro durante cinco horas en un medio que contiene la mezcla del cóctel p55 y Brefeldin A. Las células T CD8⁺ CD3⁺ fueron ensayadas mediante citometría de flujo para la producción de IFN- γ o TNF- α (Figura 5, panel A y figura 5, panel B). Los animales co-vacunados con IL-15 exhibieron

5 altas respuestas de las células T efectoras de CD8 con 2.6% de células T CD8⁺ que producen IFN- γ y 3.7% produciendo TNF- α . Estos datos ilustran que el IL-15 exhibió un profundo efecto sobre la respuesta funcional de la célula T CD8⁺.

10 **Proliferación de linfocitos de esplenocitos de murina co-Inmunizados con vacunas de IL-15 y VIH-1.**

La activación o proliferación de los linfocitos auxiliares T es vital para la expansión inmune humoral y celular. Los esplenocitos de los ratones inmunizados fueron evaluados en un ensayo básico de proliferación de

15 linfocitos para su capacidad de proliferar en respuesta a la estimulación con antígeno VIH-1 recombinante. La IL-15 no pareció tener un impacto dramático sobre las respuestas proliferativas (Figura 6). Sin embargo, se empleo IL-2 como control y se observaron claramente incrementos significativos en la proliferación de esplenocitos para la proteína env gp120 en los ratones co-

20 inyectados con plásmidos IL-2. Los esplenocitos de los ratones co-inyectados con IL-2 resultaron en índices de estimulación que fueron al menos 3 veces más grandes que aquellos de los ratones inmunizados con el control, pCgag solo, pCenv + IL-15 (Figura 6). Este dato ilustra adicionalmente que la IL-15 parece realzar la función de las células T CD8 sin una expansión dramática del

25 auxiliar de la célula T. Esto solamente ilustra que esta expansión mediante IL-

15 no es dependiente de IL-2. Esto sugiere, en tal caso, la expansión de CD4 como también la función efectora de CD8.

Mapeado del epítotope

5 Para resolver la cuestión de si el realce de las respuestas de células T CD8+ con el tratamiento con IL-15 fue debido a un incremento en el número de epitopes respondió a (esto es, dispersión del epitope) o se debió a un incremento total en el número de células T CD8+ específicas para el mismo epitope. Se emplearon el ensayo ELISPOT y la serie de péptidos obtenidos de
10 la referencia y Repositorio de Reactivo AIDS (mezclados como conjuntos en un formato de matriz). Dos epitopes fueron identificados. El epitope dominante fue mapeado para los amino ácidos Gag 197 a 211 (AMQMLKETMEEAAE-SEC ID NO:1) (Figura 7). Paterson et al han definido previamente AMQMLKETI-SEC ID NO:2 (referencia 35 abajo) como el epitope CD8
15 dominante después de la inmunización con una vacuna VIH-1 *L. monocytogenes* recombinante. Un epitope subdominante, los amino ácidos 293-307 (FRDVDRFYKTRAE – SEC ID NO: 3) (Figura 7) fue definido adicionalmente. No hubo un incremento en el número de epitopes respondidos mientras que se observaron respuestas a ambos epitopes solamente en los
20 grupos Gag inmunizados. Sin embargo, el IL-15 expandió dramáticamente la magnitud de las respuestas de estos epitopes. Solamente en los animales co-vacunados con IL-15 estaba claramente evidente el epitope subdominante. IL-15 impacta la expansión de las células efectoras CD8.

25 Ratones bloqueados con CD4

Observamos que IL-15 permitió la expansión de las células T CD8 del antígeno específico en PBMCs a partir de individuos infectados con VIH-1. También observamos inducción significativa de la célula efectora CD8 sin la dependencia de la expansión de CD4 en nuestro modelo de vacuna. Por consiguiente, se cuestiona la contribución de las células auxiliares T CD4 a la expansión inmune de IL-15. Para cubrir este aspecto, se investigó la capacidad de IL-15 para inducir una población efectora de CD8 en la ausencia completa de células CD4. Se inmunizaron ratones homocigóticos para la mutación marcada de $Cd4^{tm1Kw}$ (referencia 36 abajo). Estos ratones tenían un bloque en el desarrollo de células T CD4+ y por ende, muchos de los linfocitos en circulación son células CD8. Como el efecto de IL-15 pareció no estar involucrado en la expansión de CD4 (Figura 6) se consideró que el defecto se debió a la carencia de otra función proporcionada por las células auxiliares T, las células auxiliares T CD4 también proporcionaron ayuda para la expansión de CD8 a través de la activación de las células que presentan antígeno (APCs). En este modelo de activación APC, ligamento de CD40, sobre el APC, al ligando célula T CD40 regula hacia arriba la expresión B7 lo que permite la activación de la célula T. Las moléculas B7 proporcionan co-estimulación para la expansión de las células T CD8 en el contexto de la presentación del péptido MHC clase I. Además, Bourgeois et al, (referencia 37 abajo) demostró que CD40L puede impactar directamente el desarrollo de la célula de la memoria CD8.

Lo que ese defecto en el auxiliar CD4 se manifestaba a sí mismo en el nivel de una carencia de co-estimulación, fue considerada y explorada a

continuación Para probar esta hipótesis se co-inmunizaron ratones con plásmidos que contienen tanto IL-15 como CD40L, junto con pCgag. Se empleo una molécula CD40L anclada. La CD40L anclada sería expresada localmente y en las células inmunes en circulación, pero no sería secretada lo cual complicaría el experimento (Referencia 38 abajo). Tal vacunación puede proporcionar co-estimulación en *trans* en un modelo de plásmido (Referencia 38 abajo). De hecho, cuando se estudio pCgag en combinación con pCD40L, se indujo una respuesta inmune CD8 específica de Gag en los ratones CD40 KO (Figura 8). Este dato indica además que IL-15 impacta directamente sobre los linfocitos de la memoria CD8. En ausencia de las células CD4, el IL-15 no es capaz de inducir una respuesta celular CD8 de antígeno específico a partir de células naïve.

DISCUSIÓN

El mantenimiento y realce de una respuesta inmune CD8 específica de VIH-1 ha sido fuente de mucha investigación. Estudios recientes han reportado que el IL-15 puede jugar un papel importante en el soporte de la supervivencia de la célula de la memoria. Se observo en un modelo de ratón que la presencia de IL-15 puede conducir a una división de la célula de la memoria (Referencia 39 abajo). El análisis funcional *Ex vivo* como también los estudios que emplean ratones transgénicos que carecen genéticamente de IL-12, IL-15 o sus receptores específicos, han sido importantes en la caracterización del papel desempeñado por IL-15. De hecho, Zhang y sus colaboradores (Referencia 39 abajo) demostraron en un modelo de ratón in vivo que el IL-15 proporciona estimulación efectiva y discriminante del fenotipo de la memoria,

células CD44^{hi} CD8⁺. Y, Ku et al (Referencia 40 abajo) reportaron que la división de las células T de la memoria CD8⁺ es estimulada por IL-15 pero es inhibida por IL-2. También se encontró que el IL-2 inhibió la proliferación de células T de la memoria CD8⁺.

5

El trabajo revelado aquí demuestra que el IL-15 también es particularmente efectivo en la inducción de las células T del efector CD8⁺ *in vitro* e *in vivo*. Las células T CD8⁺ aisladas de pacientes infectados con VIH-1 fueron capaces de secretar IFN- γ a manera específica de antígeno cuando se incubo con el péptido e IL-15. El IL-15 trabajo en concierto con el TCR para estimular los linfocitos a producir IFN- γ y asumir un fenotipo efector. En algunos sujetos, el IL-15 condujo a la producción de IFN- γ en ausencia de antígeno. Esto sugiere que en la infección por VIH algunas células son activadas parcialmente y este estado de activación parcial se puede rescatar por el IL-15. Sin embargo, es de importancia que un incremento significativo en el efector funciona en todos los sujetos cuando los PBMCs fueron estimulados con ambos antígenos IL-15 y VIH-1.

Recientemente, von Adrian y colegas (Referencia 41 abajo) sugirieron que la estimulación IL-15 de los linfocitos puede resultar en células T CD8⁺ que procesan al fenotipo de la célula de la memoria directamente de las células naïve. Sin embargo, los datos de la presente sugieren que el empalme del TCR puede conducir a una activación más completa de los linfocitos T CD8⁺ lo que indica que el impacto de IL-15 solo sobre las células naïve sería mínimo. Adicionalmente, se sugirió que IL-15 conduce a las células de la memoria que

eran no-funcionales (Referencia 41 abajo). Los datos en la presente demuestran que la expansión de IL-15 resulto en células T CD8+ completamente funcionales como se evaluó en los estudios tanto en humanos como en ratones. En el ratón, el IL-15 incremento dramáticamente las respuestas de las células T CD8+ como también el realce de las respuestas de β -quimoquina e IFN- γ , indicando claramente la expansión del antígeno específico y la construcción en el trabajo anterior (Referencias 33 y 42 abajo). Esta expansión de la función de la célula T CD8+ se observo en la ausencia de la expansión de la célula T CD4+. Más aún, existe un papel importante para las células T CD4 en el desarrollo de la respuesta CD8. En estudios en ratones bloqueados con CD4, la necesidad por células T CD4 podría ser evitada mediante la utilización de CD40L. Este encuentro puede ser críticamente importante para la inmunoterapia de infecciones virales.

Muchas estrategias de inmunoterapia se han enfocado en la expansión de respuestas de células T CD8+. La infección por VIH-1 complica la terapia inmune a través de la supresión inmune viral inducida que contribuye a una carencia de un auxiliar efectivo de la célula T CD4+. A su vez, esta carencia del auxiliar es considerada como la responsable de una respuesta improductiva de la célula T CD8+. En general, las infecciones crónicas requieren de un auxiliar CD4+ para mantener el control de la replicación viral y probablemente este es el caso para la infección por VIH-1. Serbina et al (Referencia 43 abajo) demostraron que el desarrollo de las células citotóxicas T CD8+ son dependientes de la células T CD4+. Ellos adicionalmente observaron que en el bloqueo de las células T CD4, los ratones han disminuido la producción de IL-

15. Aún más, el IL-15 no es producido por las células T CD4+. Es producido de manera predominante por células estromales, monocitos y macrófagos. Es posible que exista algún mecanismo de retro-alimentación en el cual las células T CD4+ realcen la producción de IL-15, y en el caso del auxiliar reducido de CD4, finalmente las funciones de la célula T CD8+ son reducidas. Este mecanismo de retroalimentación puede explicar por qué la producción en tres de seis sujetos de IFN- γ después de la adición de IL-15 solo. En la ausencia de CD4, y por ende, a bajos niveles de IL-15, los virus residuales pueden solamente activar parcialmente los linfocitos T CD8+ en sujetos seropositivos para VIH-1. De manera importante, aquí aparece que el IL-15 puede ser adicionado *in trans* para reemplazar los defectos causados por la inmunosupresión viral. Las implicaciones de esta hipótesis deberán ser consideradas en el área de la terapia inmune para VIH-1.

En resumen, el IL-15 expandió la función efectora de las células CD8 + T en ratones y expandió la funcionalidad de las células CD8 + T aisladas de sujetos positivos con infección por VIH-1. El uso de la IL-15 como un suplemento para la terapia inmune activa, se debe considerar como una terapia adjunta a la HAART.

REFERENCIAS (cada una de las cuales fue incorporada aquí como referencia)

1. Ho, D. , 1996, Therapy of HIV infections: problems and prospects. Bull. New York Acad. Med. 73,37-45.

2. Finzi, D. , Hermankova, M. , Pierson, T., Carruth, LM. , Buck C. ,1997, Identification of a Reservoir for HIV-1 Patients on Highly Active Antiviral Therapy, Science, 278: 1295-1300.
- 5 3. Wong, J. , Hezareh, M. , Gunthard, H. , Havlir, DV. , 1997, Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia, Science, 278: 1291-1294.
- 10 4. Rosenberg, ES. , Altfield, M. , Poon, SH. , Phillips, MN., Wilkes, BM., Eldridge, RL., Robbins, GK. , D'Aquila R, T. Goulder, PJR, Walker, BD, 2000, Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection, Nature, 407: 523.
- 15 5. Koup R, Safrin J, Cao Y, 1994, Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary Human immunodeficiency virus type 1 syndrome. J of Virol, 68: 4650-4655.
- 20 6. Rinaldo C, Huang X, Fan Z, 1995, High Levels of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Memory Cytotoxic T-Lymphocyte Activity and Low Viral Load Are Associated with Lack of Disease in HIV-1 Infected Long-Term Nonprogressors, J Virol., 69:5838-5842.
- 25 7. Cao, H. , Kanki, P. , Sankale, J. , 1997, Cytotoxic T Lymphocyte Cross- Reactivity among Different HIV-1 Type 1 Clades: Implication for Vaccine Development, J Virol ; 71: 8615-8623.

152

8. Rowland-Jones S, Nixon D, Aldhous M. , 1993, HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet*, 341: 860-86.

5

9. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, 1995. HIV-specific T-células in HIV- exposed but uninfected Gambian women. *Nature Medicine*, 1: 59-64

10

10. Borrow, P, Lewicki, H, Wei, S, 1997, Antiviral pressure exerted by HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus *Nature Medicine*, 3: 205-211.

15

11. Borrow, R. Shaw GM, 1998, Cytotoxic lymphocyte escape viral variant how important are they in viral evasions of immune clearance in vivo, *Immunology Rev*, 164: 37- 51.

20

12. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA 1997, Late escape from an immunodominant cytotoxic T lymphocyte response associated with progression to AIDS, *Nature Medicine*, 3 ; 212-217.

25

13. Goulder PJ, Sewell AK, Lalloo DG, 1997, Pattern of immunodominance in HIV-1 specific cytotoxic T lymphocyte response in two human histocompatibility leukocyte antigens HLA identical siblings with HLA A0201 are influence by epitope mutations. *JExp Med*, 185: 1423-1433.

152

14. Phillips RE, Rowland-Jones, S Nixon, DF, 1991, Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition Nature, 354 ; 453-459.

5

15. Koup, RA, 1994, Virus Escape from CTL recognition, J Exp Med, 180 ; 779- 782.

16. Ayyavoo, V., Mahboubi, A., Mahalingam, S. , Ramalingam R., Kudchodkar, S. , Williams, WV. , Green, DR. , Weiner, DB, 1997, HIV-1 vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor KB, Nature Medicine, 3: 1117-1122.

17. Kerkau, T., Bacik I., Bennink, JR., Yewdell, JW., Huning, T., Schimpl, A., Schubert, U, 1997, The human immunodeficiency virus type I (HIV-1) vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, J Exp Med., 185: 1295-1305.

18. Lenburg, M. E. , and Landau N. R. , 1993, VPU induced degradation of CD4: Requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4, J Virol, 67: 6542-6550.

19. Anderson, S. , Shugar, D. C. , Swanstrom, R. , Garcia, J. V. , 1993, Nef from primary isolates of human immunodeficiency virus type I

suppressed surface CD4 expression in human and mouse T células J Virol 67 : 4923-4931.

20. Rosenberg, ES, Billings, JM, Caliendo, AM, et al. , Vigorous HIV-1
5 Specific CD4 T cell Responses Associated with Control of Viremia, Science, 278: 1447-1450, (1997).

21. Kalam, SA, Walker BD. , 2000, The critical need for CD4 help in
maintaining effective cytotoxic T Shankar P. Russo M. Hamisch B. Patterson M.
10 Skolnik P. Lieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8 (+) T
células in chronic human immunodeficiency virus infection. Blood. 96 (9): 3 094-
101.

22. Murali-Krishna, K., Lau., LL., Sambliara, S., Lemonnier, F.,
15 Altman, J., Ahmed, R. , 1999, Persistence of Memory CD8 T Células in MHC
Class I-Deficient Mice, Science, 286 :1377-1383.

- * 23. Tagaya, Y. , Bamford, RN. , Defilippis, AP, Waldmann, TA. , 1996,
IL-15: A Pleiotropic Cytokine with Diverse Receptor/Signaling Pathways Whose
20 Expression is Controlled at Multiple Pathways. Immunity 4: 329-336.

24. Chang, KH, Kim, JM, Kim HY, Sorig, YG, Choi, YH, Park, YS,
Cho, JH, Hong, SK. , 2000, Spontaneous Programmed Cell Death of Peripheral
Blood Mononuclear Células from HIV-Infected Persons is Decreased with IL-
25 15.Yonsei Medical Journal, 41: 112- 118.

25. Naora H. , Gougeon, ML. , 1999, Enhanced Survival and Potent Expansion of the Natural Killer Population of HIV Infected Individuals by Exogenous IL-15. *Immunology Letters*, 68: 359-367.

5

26. Lin, SJ, Roberts, RL, Ark, BJ, Nguyen, OH, Thomas, EH, Stich, ER. , 1997, Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type-1 GP120-Specific Cell Mediated Cytotoxicity Interleukin-2 (IL-2), IL-12, and IL-15. *Clin. Imm. Ininipati*, 82: 163-173.

10

27. Loubeau, M., Ahmad A., Toma E., Menezes, J., 1997, Jo. Enhancement of Natural Killer and Antibody Dependent Cytotoxic Activities of the Peripheral Mononuclear Cells of HIV-Infected Patients by Recombinant IL-15. *AIDS* 16: 137-145.,

15

28. Kacani, L., Sprizl GM. , Erdei, A. , Dierich, MP, 1999, Interleukin-15 Enhances HIV-1 Driven Polyclonal B-Cell Response in Vitro. *Exp and Clin Immun*, 16: 167-179.

20

29. Kacani, L. , Stoiber H. , Dierich, MP, 1997, Role of IL-15 in HIV-1 Associated Hypergammaglobulinemia. *Clin Exp linm* 108: 14-18.

25

30. Agostini, C. , Zambello, R. , Perrin A. , Piazza, F., Siviero, M. , Basso, U., Borfolin, M. , Trentin L. , Semenatao, G. , 1999, CD8 T-Cell Infiltration in Extravascular Tissues of Patients with Human Immunodeficiency

Virus Infection. Interleukin 15 Upmodulates Co-Stimulatory Pathways Involved in the Antigen Presenting Cells of T-cell Interaction. Blood, 93: 1277-1286.

31. Patki, AH. , Quinone S. , Mateo, ME. , Dorazio, D., Yen-Lieberman B., Boom WH, Thomas, EK. , Ledermann MM, 1996, Activation of antigen Induced Lymphocyte Proliferation by Interleukin-15 Without the Mitogenic Effect of Interleukin-2 That May Induce Human Immunodeficiency Virus-1 Expression. JCI, 98: 616-621.

10 32. Lucey DR. , Pinto LA, Bethke, FR., Rusnak J. , Mekher GP, Hashemi, FN, Landay, AL. , Kessler, HA, Paxton, RJ. , Grabstein, K. , Shearer GM. , In Vitro Immunologic and Virologic Effects of Interleukin-15 on Peripheral Blood Mononuclear Cells from Normal Donors and Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infected Patients. Clin Diagn Lab Imm, 4: 43-48.

15

33. Kim, J J. Trivedi, NN. , Nottingham, LK. , Morrison, L. , Tsai, A. , Hu, Y., Mahalingam, S. , Dang, K., Alm, L. , Doyle, NK. , Wilson, D. , Chattergoon, MA., Chalian, AA. , Boyer, JD. , Agadjanyan, M. , Weiner, DB. , 1998, Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cassettes with DNA immunogens, Eur. J. Immunol. 28 : 1089-1103.

20

34. Kim JJ. Tsai A. Nottingham LK. Morrison L. Cuning DM. Oh J. Lee DJ. Dang K. Dentchev T. Chalian AA. Agadjanyan MG. Weiner DB, 1999,

Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells in vivo, *Journal of Clinical Investigation*. 103: 869-77.

35. Mata, M. , Travers, PJ. Liu, Q. , Frankel, FR., Paterson, Y. , 1998,
5 The MHC Class I Restricted Immune Response to HIV-1 gag in Balb/c Mice
Selects a Single Epitope That Does not Have a Predictable MHC Binding-Motif
and Binds to Kd Through Interactions Between a Glutamine at PS and Pocket
D, *Joof Immun.*, 161: 2985-2993.

- 10 36. McCarrick III JW, Parties JR, Seong RH, Solter D, Knowles BB.
1993. Positive-negative selection gene targeting with the diphtheria toxin A-
chain gene in mouse embryonic stem cells. *Transgenic Res* 2:183-190.

37. Bourgeois, C. , Rocha, B. , Tanchot, C. , A Role for CD40
15 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory, 2002,
Science 297: 2060-2063.

38. Sin JI. Kim JJ. Zhang D. Weiner DB. Modulation of cellular
responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen-specific
20 helper T cell type 1 CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes
simplex virus type 2 in vivo. *Human Gene Therapy*. 12: 1091-102, 2001.

39. Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, DF. Sprent, 1998, J.,
Immunity, 8: 591- 599.

40. Ku, CC., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., Marrack. P., 2000, Control of Homeostasis of CD8 Memory T Células by Opposing Cytokines, *Science*, 288 : 675- 678.
- 5 41. Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, MA. Hieshmina, K. , Springer, TA. , Fan, X. , Shen, H. , Lieberman, J. , von Andrian, UH., 2001, Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes, *Journal of Clinical Investigation*, 108: 871-878.
- 10 42. Moore AC. Kong WP. Chakrabarti BK. Nabel GJ. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. *Journal of Virology*. 76(1) : 243-50, 2002 Jan
- 15 43. Serbina NV. Lazarevic V. Flynn JL 2001, CD4 (+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8 (+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*. 167: 6991-7000.

Ejemplo 2

- 20 Hay un requerimiento para las células Th CD4 (+) y para la producción de IFN-gama para el control de la replicación viral en individuos inmuno comprometidos así como también en la inmunología antitumoral. Los datos de los experimentos desarrollados demuestran que el requerimiento para las células T ayuda para que la expansión del efecto de CD8 ó de las células T
- 25 puedan ser reemplazado por la producción local de IL-15 y CD40L en el sitio de

la vacuna. Experimentos empleando ratones en los cuales las células T CD4 (+) fueron eliminadas por medio del bloqueo del gen de la MHC clase II de cadena beta (MHC II KO), revelan que la iniciación de los animales con antígeno gag + IL-15 + CD40L lleva a la activación de las células T CD8. La
5 activación es medida por medio de la producción de IFN-gama como puntos. Mayores de 50 puntos en este análisis son positivos. Estos datos, mostrados en la Figura 9, ilustran un método simple para la activación del efecto o las células T CD8 independientemente de la ayuda de las células T CD4 (+). Estos estudios tienen importancia para el tratamiento de individuos
10 inmunocomprometidos.

Ejemplo 3

cADN IL-15 de humano, ratón, y simio codifica un residuo de 162 aminoácidos (aa) de proteína precursora que contiene un residuo líder de 48 aa que es
15 clivado para generar IL-15 madura residuo de 114 aa. El IL-15 humano comparte identidad en la secuencia de aproximadamente 97% y 73% con IL-15 de simio y ratón, respectivamente. Ambos IL-15 humano y de simio son activos sobre células de ratón. Aunque la estructura de IL-15 no ha sido determinada, se predice que es similar a IL-2 y otros miembros de la familia citocina de
20 paquete de cuatro hélices. (Grabstein, K. et al. (1994) Science 264: 965, Anderson, D. M. et al. (1995) Genomics 25:701 ; y Bamford, R. N. et al. (1995) Cytokine 7: 595, Brandhuber, B. J. et al. (1987) Science 238: 1707, ambos son incorporados aquí como referencia.)

25 ARNm de IL-15 han sido detectados en el corazón, los pulmones, el hígado, la

placenta, el músculo esquelético, las células adherentes periféricas mononucleares de la sangre, APCs (células Dendríticas), y las líneas celulares epiteliales y fibroblastos. Sin embargo, el ARNm de IL-15 no es detectable en células T periféricas activadas de la sangre que contienen altos niveles de ARNm de IL-2. La IL-15 ha demostrado que estimula el crecimiento de células naturales asesinas, linfocitos T sanguíneos periféricos activados, linfocitos que infiltran el tumor (TILs), y células B. Además, también se ha mostrado que IL-15 es quimioatractor para linfocitos T de sangre humana, para inducir la actividad destructora activada por linfocina (LAK) actividad en células NK, y para inducir la generación de células efectoras citolíticas. (Armitage, R. J. et al. (1995) J. Immunol. 154:483 ; P. Wilkinson and F. Liew (1995) J. Exp. Med. 181:1255 ; Grabstein, K. et al. (1994) Science 264:965 ; Giri, J. G. et al. (1994) EMBO J. 13: 2822 ; y Giri, J.G. et al. (1995) EMBO J. 15: 3654, cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.).

15

Debido a que IL-15 es una citocina Th1 prototípica, y por virtud de su actividad como un estimulador de las células T, células NK, células LAK, y TILs, IL-15 es un emocionante candidato para su empleo como un ayudante junto con vacunas de ADN tales como vacunas para VIH para incrementar las respuestas inmuno celulares. La IL-15 amplía los CTLs específicos para VIH, y la sobreproducción de IL-15 esta asociada con enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn.

El análisis de mancha del norte indica una dispersión constitutiva de la expresión de IL-15. El control de la expresión ocurre post-transcripcionalmente

25

en el nivel de traducción y translocación (trafficking intracelular). El ARNm de IL-15 incluye un número de elementos que impiden su traducción en la proteína incluyendo: 1) las 5'AUGs son cargadas con AUGs corriente arriba que interfieren efectivamente en la traducción de IL-15 (5 en ratones, 12 en humanos); 2) el codon de inicio para la secuencia que codifica IL-15 tiene un contexto debil KOZAK (GTAATGA); y 3) presencia de un elemento negativo en el C-terminal de la secuencia que codifica la proteína IL-15 madura. (Grabstein et al., (1994) Science 264: 965-968, Bamford et al. , (1996) PNAS 93: 2897-2902; Bamford et al., (1998) J. Immunol 160:4418-4426; y Kozak et al., (1991) J. Cell Biol. 115: 887-903, cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia. Cada uno de estos tres controles puede ser eliminado para mejorar la expresión.

Las isoformas de IL-15 nativa contienen dos péptidos líderes: un péptido señal de 21 aa (SSP) o un péptido señal de 48 aa (LSP) (Waldmann et al. Ann. Rev. Immunol. (1999) 17: 19-49, el cual es incorporado aquí como referencia.

La siguiente estrategia fue seguida para incrementar la expresión de IL-15 a través de la optimización de constructos de ADN de IL-15 para inmunización. Los iniciadores fueron diseñados para amplificar IL-15 a partir del péptido señal inicial, de tal manera que la corriente ascendente inhibitoria AUGs no esta presente en el mensaje final de IL-15. Los iniciadores fueron diseñados para incluir un fuerte contexto KOZAK (GCCGCCACC). El elemento regulatorio C-terminal negativo fue removido empleando un diseño antisentido por PCR.

Los iniciadores son expuestos en la Figura 10.

La siguiente estrategia para incrementar la expresión de IL-15 a través del
5 reemplazo del aminoácido 48 del péptido señal IL-15 (LSP) con IgE líder fue
llevada a cabo. Los iniciadores de sentido fueron diseñados para iniciar
después del aa 48 de LSP mientras el iniciador antisentido era amplificado a
partir del sitio de parada.

10 Los iniciadores fueron diseñados para incluir un fuerte contexto KOZAK
(GCCGCCACC - SEC ID NO : 4). Un iniciador de sentido fue diseñado para
contener la secuencia para IgE líder secuencia más un sitio inicial ATG. Los
iniciadores son expuestos en la Figura 11.

15 Varios constructos fueron preparados y empleados para transfectar células RD.
La producción de la proteína IL-15 fue medida para los varios constructos. Los
datos son mostrados en las Figuras 12, paneles A-C. La figura 13A muestra
una comparación de la expresión para constructos humanos que incluyen
secuencias que codifican para el péptido señal de 21 aminoácidos enlazado a
20 IL-15 (IL-15SSP-izquierda) y secuencias que codifican para el péptido señal de
48 aminoácidos humano (IL-15 LSP-derecha). La Figura 12, panel B muestra
una comparación de la expresión por medio de constructos humanos que
incluyen secuencias para el péptido señal de 48 aminoácidos (IL-15 humana
LSP-izquierda) y secuencias que codifican para el péptido señal IgE (IL-15
25 humana-IgE-derecha). La Figura 12, panel C muestra una comparación d ela

expresión por medio de constructos de macaco que incluyen secuencias que codifican para el péptido señal de 48 aminoácidos (Mac IL-15 LSP-izquierda) y secuencias que codifican para el péptido señal IgE (Mac IL-15- IgE-derecha).

5 La bioactividad de IL-15 fue medida de la proteína IL-15 producida a partir de varios constructos. Los datos son mostrados en las Figuras 13 paneles A y B. La figura 13, panel A muestra una comparación de bioactividad de IL-15 entre constructos humanos que incluyen el péptido señal de 48 aminoácidos (IL-15 humana LSP-izquierda) y secuencias que codifican para el péptido señal IgE
10 (IL-15 humana-IgE-derecha). La Figura 13, panel B muestra una comparación de la bioactividad de IL-15 entre constructos de macaco que incluyen secuencias que codifican para el péptido señal de 48 aminoácidos (Mac IL-15 LSP-izquierda) y secuencias que codifican para el péptido señal IgE (Mac IL-15- IgE-derecha).

15

Un constructo fue hecho empleando el vector de expresión pVAX con una inserción de una secuencia que codifica IL-15 enlazada a la secuencia que codifica para un péptido señal IgE. El constructo que codifica para Gag VIH-1 también fue generado. Los experimentos inmunológicos fueron desarrollados
20 comparando los efectos sobre las respuestas inmunes empleando plasmidos diseñados de IL-15 en combinación con Gag VIH-1. Ratones Balb/c fueron vacunados de acuerdo con el esquema de inmunización mostrado en la Figura 14.

25 Las respuestas inmunes fueron estudiadas por medio de comparación de la

restimulación de la producción de un antígeno específico IFN- γ en las 5 semanas siguientes a la tercera inmunización. Los datos son mostrados en la Figura 15. Grupos vacunados incluyen ratones nativos, ratones vacunados con el vector pCDN3, ratones vacunados con constructos que codifican Gag VIH-1, 5 ratones vacunado con constructos que codifican Gag VIH-1 e IL-15 enlazada al aminoácido 48 del péptido señal y los ratones vacunados con constructos que codifican Gag VIH-1 enlazado al péptido señal IgE.

Ejemplo 4

10 Una vacuna de plasmido IL-15 diseñado fue construida por medio de la remoción d ela región Kozak de la IL-15 nativa, las AUG's y las UTRs. El plasmido IL-15 diseñado fue proporcionado con la secuencia que para el péptido señal IgE. La IL-15 diseñada fue expresada en un nivel de 30 a 50 veces mayor que el observado con un plasmido comparable tipo primitivo. La 15 respuesta inmune observada en ratones co-inmunizados con constructos IgE-señal-IL-15 y Gag VIH-1 fue significativamente mayor que en los ratones inmunizados con el constructo Gag VIH-1 solo. Los datos son mostrados en la Figura 16.

Ejemplo 5

El ADNc aislado que codifica las proteínas inmunomoduladoras es útil como material de partida en la construcción de constructos que pueden producir esa proteína inmunomoduladora.

25 En alguna realizaciones, son proporcionados constructos en los cuales las

secuencias que codifican para una de las siguientes proteínas inmunomoduladoras son enlazadas al péptido de la señal IgE. En algunas realizaciones, tales constructos son proporcionados como parte de vacunas y composiciones inmunomoduladoras tales como aquellas descritas aquí.

5

Empleando técnicas estándar y materiales de partida ya disponibles, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína inmunomoduladora puede ser preparada e incorporada en constructos, vectores, vacunas, etc., como se describió aquí.

10

El número de acceso del Genbank AF031167 se refiere a la secuencia completa que codifica el ARNm de IL-15 humana. Los números de acceso del Genbank Y09908, X91233, X94223 y X94222 también se refieren a secuencias de IL-15 humana. Cada secuencia es incorporada aquí como referencia.

15

El número de acceso del Genbank L07414 se refiere a la secuencia completa que codifica ARNm del ligando CD40 humano. La secuencia es incorporada aquí como referencia.

20 El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para Bax es L22473, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para TRAIL es U37518 ó AF023849, los cuales son incorporados

25 aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para TRAILrecDRC5 es U90875 ó AF016266, los cuales son incorporados aquí como referencia. También son incorporados como referencia

5 TRAIL-R2 AF016849; TRAIL-R3 AF014794 ; y TRAIL-R4 AF021232.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para RANK es AF018253 el cual es incorporado aquí como referencia.

10

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para RANK LIGAND es AF019047 ó AF333234, los cuales son incorporados aquí como referencia.

15 El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para Ox40 es X75962, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de

20 aminoácidos para Ox40 LIGAND es X79929 ó AB007839, los cuales son incorporados aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para NKG2D es AF461811 ó X54870, los cuales son incorporados

25 aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para MICA es X92841, el cual es incorporado aquí como referencia.

5

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para MICB es U65416, el cual es incorporado aquí como referencia.

10 El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para NKG2A es X54867, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para NKG2B es X54868, el cual es incorporado aquí como referencia.

15 El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para NKG2C es X54869 ó AJ0016984, los cuales son
20 incorporados aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para NKG2E es L14542, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para NKG2F es AH006173, U96845 ó U96846, los cuales son incorporados aquí como referencia.

5

El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para CD30 es M83554, (Durkop, H et al. Cell 68 (3), 421-427 (1992)) el cual es incorporado aquí como referencia.

10 El número de acceso del GENBANK para el nucleótido y las secuencias de aminoácidos para CD153 (CD30L) es L09753, (Smith, C. A. , et al. Cell 73 (7), 1349-1360 (1993)) los cuales son incorporados aquí como referencia. El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para Fos es K00650 ó V01512, los cuales son incorporados aquí como referencia.

15

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para c-jun J04111 ó M29039, los cuales son incorporados aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para Sp-
20 1 es BC021101, BC005250, BC002878, M31126, J02893 ó X15102, los cuales son incorporados aquí como referencia.

La secuencia de nucleótido para Apl puede ser identificada como se describió en Lee et al, 1987 Cell 49: 741-752, Rauscher et al. 1988 Science 240: 1010 -

1016, y Chiu et al, 1988 Cell 54: 541- 552, los cuales son incorporados aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleotidos para Ap-
5 2 es M36711, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleotidos para p38
es U66243, el cual es incorporado aquí como referencia.

10 El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleotidos para
p65Rel es L19067, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleotidos para
MyD88 es U70451, el cual es incorporado aquí como referencia.

15

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleotidos para
IRAK es NM001569, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleotidos para
20 TRAF6 es U78798, el cual es incorporado aquí como referencia.

La secuencia de nucleotidos para I κ B puede ser encontrada como se describe
en Gilmore et al. Trends Genet 1993 Dec; 9 (12): 427-33, el cual es
incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para NIK es Y10256, el cual es incorporado aquí como referencia.

- 5 La secuencia de nucleótidos para SAP K puede ser encontrada como se describe en Franklin et al. Oncogene. 1995 Dec 7; 11 (11) : 2365-74. el cual es incorporado aquí como referencia.

- 10 El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para SAP1 es M85164 ó M85165, cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK2 es L31951, el cual es incorporado aquí como referencia.

15

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK1B2 es U35005; el cual es incorporado aquí como referencia.

- 20 El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK1B1 es U35004 ; el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK2B2 es U35003; el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK2B1 es U35002; el cual es incorporado aquí como referencia.

- 5 El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK1A2 es U34822; el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK2A1 es U34821; el cual es incorporado aquí como referencia.

10

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK3A1 es U34820 ; el cual es incorporado aquí como referencia.

- El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para JNK3A2 es U34819, el cual es incorporado aquí como referencia.
- 15

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para NF-kappa-B2, p49 forma del empalme es A57034, el cual es incorporado aquí como referencia.

20

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para NF-kappa-B2, p100 forma del empalme es A42024, el cual es incorporado aquí como referencia.

- 25 El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para NF-

kappa-B2, p105 forma del empalme es S17233, el cual es incorporado aquí como referencia.

El número de acceso del GENBANK para la secuencia de nucleótidos para NF-
5 kappa-B50K precursor de cadena es A37867, el cual es incorporado aquí como referencia.

La secuencia de nucleótido para NFkB p50 es descrita en Meyer R., et al.
(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (3), 966 970, la cual es incorporada aquí
10 como referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-1 α humana son bien
conocidas y expuestas en Telford, et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 9955-
9963, Furutani, et al. (1985) Nucl. Acids Res. 14: 3167-3179, March, et al.
15 (1985) Nature 315: 641-647, y el código de acceso Swissprot P01583, cada
uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-2 humana son bien
conocidas y expuestas en Holbrook, et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:
20 1634-1638, Fujita, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7437-7441,
Fuse, et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12: 9323- 9331, Taniguchi, et al. (1983)
nature 302: 305-310, Meada, et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 115:
1040-1047, Devos, et al. (1983) Nucl. Acids Res. 11: 4307-4323, y código de
acceso Swissprot P01585, cada uno de los cuales es incorporado aquí como
25 referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-4 humana son bien conocidas y expuestas en Arai, et al. (1989) J. Immunol. 142: 274-282 Otsuka, et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15: 333- 344, Yokota, et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 5894-5898, Noma, et al. (1984) Nature 319: 640-646, Lee, et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2061-2063, y el código de acceso Swissprot 05112 (el código de acceso para IL-4 murino es Swissprot 07750), Cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

10 Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-5 humana son bien conocidas y expuestas en Campbell, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6629-6633, Tanabe, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 16580-16584, Campbell, et al. (1988) Eur. J. Biochem. 174: 345-352, Azuma, et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 9149-9158, Yokota, et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7388-7392, y el código de acceso Swissprot P05113, cada uno de los
15 cuales es incorporado aquí como referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-10 humana son bien conocidas y expuestas en Viera, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:
20 1172 - 1176, y código de acceso Swissprot P22301.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-15 humano son bien conocidas y expuestas en Grabstein, et. al. (1994) Science 264: 965-968, y código de acceso Swissprot U03099, cada uno de los cuales es incorporado
25 aquí como referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de IL-18 humana son bien conocidas y expuestas en Ushio, et al. (1996) J. Immunol. 156: 4274-4279, y código de acceso D49950, cada uno de los cuales es incorporado aquí como
5 referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de TNF- α son bien conocidas y expuestas en Pennica, (1984) Nature 312: 724-729, y el código de acceso Swissprot P01375, cada uno de los cuales es incorporado aquí como
10 referencia.

Las secuencias de nucleótido y aminoácidos de TNF-P son bien conocidas y expuestas en Gray, (1984) Nature 312: 721-724, y el código de acceso Swessprot P01374, cada uno de los cuales es incorporado aquí como
15 referencia. secuencias de aminoácidos de IL-10 humano son bien conocidas y expuestas en Viera, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1172-1176, y el código de acceso Swissprot P22301, cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

20 La secuencia completa que codifica para el ARNm de interleucina-12 humana, es expuesta en los números de acceso del Genbank AF180563 (P40 ARNm) y AF180562 (P35 ARNm) y en la Patente U.S. Número 5,840, 530, cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

25 Información de la secuencia para MadCAM-1 se encuentra en el número de

acceso del Genbank U80016 (Leung, E., et al, Immunogenetics 46 (2), 111-119 (1997)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

5 Información de la secuencia para MadCAM-1 se encuentra en el número de acceso del Genbank U43628 (Shyjan, A. M. , et al, J. Immunol. 156 (8), 2851-2857 (1996)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

10 Información de la secuencia para NGF se encuentra en el número de acceso del Genbank M57399 (Kretschmer, P. J. , et al., Growth Factors 5,99-114 (1991)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

15 Información de la secuencia para IL-7 se encuentra en el número de acceso del Genbank J04156 (Goodwin, R. G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1), 302-306 (1989)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para VEGF se encuentra en el número de acceso del Genbank M32977 (Leung, D. W., et al., Science 246,1306-1309 (1989)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

20 Información de la secuencia para TNF-R se encuentra en el número de acceso del Genbank M60275 (Gray, P. W. , et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87,7380 - 7384 (1990)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para TNF-R se encuentra en el número de acceso

del Genbank M63121 (Himmeler, A., et al. DNA Cell Biol. 9,705-715 (1990)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

5 Información de la secuencia para Fas se encuentra en el número de acceso del Genbank M67454 (Itoh, N., et al., Cell 66 (2), 233-243 (1991)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

10 Información de la secuencia para CD40L se encuentra en el número de acceso del Genbank L07414 (Gauchat, J. F. M., et al. FEBS Lett, 315,259-266 (1992), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

15 Información de la secuencia para IL-4 se encuentra en el número de acceso del Genbank M23442 (Arai, N. , et al. , J. Immunol. 142 (1), 274-282 (1989)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

20 Información de la secuencia para IL-4 se encuentra en el número de acceso del Genbank M13982 (Yokota, T., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83 (16),5894-5898 (1986)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

25 Información de la secuencia para CSF se encuentra en el número de acceso del Genbank M37435 (Wong, G. G., et al. Science 235 (4795),1504-1508(1987)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para G-CSF se encuentra en el número de acceso

del Genbank X03656 (Nagata, S., et al, EMBO J. 5 (3), 575-581 (1986)), cada uno de los cuales es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para G-CSF se encuentra en el número de acceso
5 del Genbank X03655 (Nagata, S., et al., EMBO J. 5 (3), 575-581 (1986)), los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para GM-CSF se encuentra en el número de acceso del Genbank M1 1220 (Lee, F., et al., Proc. Ntl. Acad. Sci. U. S. A. (13),
10 4360-4364 (1985)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para GM-CSF se encuentra en el número de acceso del Genbank M10663 (Wong, G. G., et al., Science 228 (4701), 810-815
(1985)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

15

Información de la secuencia para M-CSF se encuentra en el número de acceso del Genbank M27087 (Takahashi, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 (2), 892-901 (1989)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

20 Información de la secuencia para M-CSF se encuentra en el número de acceso del Genbank M37435 (Wong G. G., et al., Science 235 (4795), 1504-1508 (1987)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para LFA-3 se encuentra en el número de acceso

del Genbank Y00636 (Wallner, B. P., et al., J. Exp. Med. 166 (4), 923-932 (1987)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para ICAM-3 se encuentra en el número de acceso
5 del Genbank X69819 los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para ICAM-2 se encuentra en el número de acceso
del Genbank X15606 (Staunton, D. E., et al., Nature 339 (6219), 61-64 (1989))
los cuales son incorporados aquí como referencia.

10

Información de la secuencia para ICAM-1 se encuentra en el número de acceso
del Genbank J03132 (Staunton, D. E., et al., Cell 52 (6), 925-933 (1988)) los
cuales son incorporados aquí como referencia.

15 Información de la secuencia para PECAM se encuentra en el número de
acceso del Genbank M28526 (Newman, P. J., et al., Science 247,1219-1222
(1990)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para P150. 95 se encuentra en el número de
20 acceso del Genbank Y00093 (Corbi, A. L., et al., EMBO J. 6 (13), 4023-4028
(1987)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para Mac-1 se encuentra en el número de acceso
del Genbank J03925 (Corbi, A. L., et al., J. Biol. Chem. 263 (25), 12403-
25 12411(1988)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para LFA-1 se encuentra en el número de acceso del Genbank Y00796 (Larson. R., et al., J. Cell Biol. 108 (2), 703-712(1989)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

5

Información de la secuencia para CD34 se encuentra en el número de acceso del Genbank M81104 (Simmons, D. L. et al., J. Immunol. 148, 267 - 271 (1992)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

10 Información de la secuencia para RANTES se encuentra en el número de acceso del Genbank M21121 (Schall, T. J., et al., J. Immunol. 141, 1018 – 1025 (1988)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

15 Información de la secuencia para IL-8 se encuentra en el número de acceso del Genbank M28130 (Mukaida, N., et al., J. Immunol. 143 (4), 1366 - 1371 (1989)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

20 Información de la secuencia para MIP-la se encuentra en el número de acceso del Genbank U72395 (Fridell, R. A. , et al. , J. Cell. Sci 110 (pt 11), 1325 - 1331 (1997)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para E-selector se encuentra en el número de acceso del Genbank M24736 (Bevilacqua, M. P., et al., Science 243 (4895), 1160 - 1165 (1989)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para CD2 se encuentra en el número de acceso del Genbank M14362 (Sewell, W. A. , et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83,8718-8722 (1986); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7256 - 7256 (1987)) los
5 cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para MCP-1 se encuentra en el número de acceso del GenbankS69738 (Li, Y. S., et al., Mol. Cell. Biochem. 126 (1),61-68 (1993)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

10

Información de la secuencia para L-selection se encuentra en el número de acceso del Genbank X16150 (Tedder, T. F., et al., J. Exp. Med. 170 (1), 123 - 133 (1989)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

15 Información de la secuencia para P-selection se encuentra en el número de acceso del Genbank M25322 (Johnston, G. I., et al., Cell 56, 1033 - 1044 (1989) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para FLT se encuentra en el número de acceso del
20 Genbank X94263 (Mandriota, S. J., et al., J. Biol. Chem. 271 (19), 11500-11505 (1996)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para FLT se encuentra en el número de acceso del Genbank X51602 (Shibuya, M. et al. Oncogene 5 (4), 519 - 524 (1990) Han, H.

J., et al. Hum. Mol. Genet. 2 (12), 2204 (1993)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para Apo-1 se encuentra en el número de acceso del Genbank X63717 (Oehm, et al, J. Biol. Chem., (1992), 267 (15), 10709 - 15) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para Fas se encuentra en el número de acceso del Genbank M67454 (Itoh, et al., Cell, (1991), 66 (2), 233-43) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para TNFR-1 se encuentra en el número de acceso del Genbank M67454 (Nophar, et al., EMBO J., 1990,9 (10), 3269-78) los cuales son incorporados aquí como referencia.

15

Información de la secuencia para p55 se encuentra en el número de acceso del Genbank M58286 (Loetscher, et al., Cell, 1990,61, 351-359) los cuales son incorporados aquí como referencia.

20 Información de la secuencia para WSL-1 se encuentra en el número de acceso del Genbank Y09392 (Kitson, et al. , Nature, 1996,384 (6607), 372-5) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para DR3 se encuentra en el número de acceso

del Genbank U72763 (Chinnaiyan, et al., Science, 1996,274(5829), 990-2) los cuales son incorporados aquí como referencia.

5 Información de la secuencia para TRAMP se encuentra en el número de acceso del Genbank U75381 (Bodmer, et al., Immunity, 1997,6 (1), 79-88) los cuales son incorporados aquí como referencia.

10 Información de la secuencia para Apo-3 se encuentra en el número de acceso del Genbank U74611 (Marsters, et al., Curr. Biol., 1996,6 (12), 1669-76) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para AIR se encuentra en el número de acceso del Genbank U78029 which es incorporado aquí como referencia.

15 Información de la secuencia para LARD se encuentra en el número de acceso del Genbank U94512 (Screaton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997,94 (9), 4615-19) los cuales son incorporados aquí como referencia.

20 Información de la secuencia para NGRF se encuentra en el número de acceso del Genbank M14764 (Johnson, et al., Cell, 1986,47 (4), 545-554) los cuales son incorporados aquí como referencia.

25 Información de la secuencia para DR4 (TRAIL) se encuentra en el número de acceso del Genbank U90875 (Pan, et al., Science, 1997,276 (5309), 111-113) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para DR5 se encuentra en el número de acceso del Genbank AF012535 (Sheridan, et al. , Science, 1997,1 227 (5327), 818-821) los cuales son incorporados aquí como referencia.

5

Información de la secuencia para KILLER se encuentra en el número de acceso del Genbank AF022386 (Wu, et al. , Nat. Genet. 17 (2), 141-143 (1997)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

10 Información de la secuencia para TRAIL-R2 se encuentra en el número de acceso del Genbank AF020501 el cual es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para TRICK2 se encuentra en el número de acceso del Genbank AF018657.

15

Información de la secuencia para DR6 se encuentra en el número de acceso del Genbank AF068868, el cual es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para ICE se encuentra en los números de acceso
20 del Genbank U13697, U13698 y U13699 (Alnemri, E. S., et al., J. Biol. Chem. 270 (9), 4312-4317 (1995)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

Información de la secuencia para VLA-1 se encuentra en el número de acceso del Genbank X17033 (Takada., et al., J. Biol. Chem. 109 (1), 397-407(1989)) el
25 cual es incorporado aquí como referencia.

Información de la secuencia para CD86 (B7.2) se encuentra en el número de acceso del Genbank U04343 (Azuma, et al., Nature. 366 (6450), 76 (1993)) los cuales son incorporados aquí como referencia.

5

Tabla 1

Familia Picornavirus

10 Genero: Rhinovirus: (Médico) responsables del 50% de los casos de resfriado común.

 Etheroviruses: (Médico) incluye poliovirus, coxsackievirus, echovirus, y enterovirus humanos tales como el virus de la hepatitis A.

15 Aphovirus: (Veterinario) estos son los virus de la fiebre aftosa.

 Antigenos Blanco (objetivo): VPI, VP2, VP3, VP4, VPG

Familia Calcivirus

20 Genero: Virus del Grupo Norwalk: (Médico) estos virus son un importante agente causativo de la gastroenteritis epidemica.

Familia Togavirus

25 Genero: Alfavirus: (Médico y Veterinario) Ejemplos incluyen virus Senilis, virus RossRiver y Encefalitis Equina Oriental y Occidental.

Reovirug: (Médico) virus de la Rubeola.

Familia Flariviridue

Ejemplos incluyen: (Médico) dengue, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis de St. Louis y virus de encefalitis nacido de garrapata.

Virus del Oeste del Nilo (Genbank NC001563, AF533540, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, M12294, AF317203, AF196835, AF260969, AF260968, AF260967, AF206518 y AF202541)

Antigenos Blanco Representativos:

Virus de la Hepatitis C: (Médico) estos virus aún no han sido colocados en una familia pero se cree que pueden ser un togavirus o un flavivirus. La mayor semejanza es con la familia togavirus.

Familia Coronavirus: (Médico y Veterinario)

virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral)

virus gastroenterico transmisible porcino (cerdo)

virus de encefalomielitis hemaglutinante porcina (cerdo)

virus de la peritonitis infecciosa Felina (gatos)

coronavirus enterico Felino (gato)

Coronavirus Canino (perro)

Coronavirus asociados a SARS

Los coronavirus respiratorios humanos causan ~ 40 casos de resfriado común.

EX. 224E, OC43

Nota – los coronavirus pueden causar hepatitis non-A, B ó C

Antígenos blanco:

- 5 E1 – también llamada M o proteína de matriz
- E2 – también llamada S o proteína de punto
- E3 - también llamada BE o glicoproteína hemaglutin-éterosa (no esta
 presente en todos los coronavirus)
- N-nucleocapsida

10

Familia Rhabdovirus

Genero: Vesiliovirus

Lyssavirus: (médico y veterinario)

conejos

15 Antígeno blanco: proteína G

 proteína N

Familia Filoviridae: (Médico)

 virus de fiebre hemorrágica tales como Marburg y virus del

20

 Ebola

Familia Paramyxovirus:

Genero: Paramyxovirus: (Médico y Veterinario)

 virus de las paperas, virus de la enfermedad de New Castle

25

 (patógeno importante en pollos)

Morbillivirus: (Médico y Veterinario)

Sarampión, moquillo canino

Pneuminvirus: (Médico y Veterinario)

virus sincial Respiratorio

5

Familia Orthomyxovirus (Médico)

El virus de la Influenza

Familia Bungavirus

10

Genero: Bungavirus: (Médico) encefalitis Californiana, LA Crosse

Flebovirus: (Médico) Fiebre del Valle de la Grieta

Hantavirus: Puremala es un virus de la fiebre de hemahagin

Nairvirus (Veterinario) Enfermedad de las ovejas de Nairobi

También muchos bungavirus no asignados

15

Familia Arenavirus (Médico)

LCM, virus de la fiebre de Lassi

Familia Reovirus

20

Genero: Reovirus: un posible patogeno humano

Rotavirus: gastroenteritis aguda en niños

Orbiviruses: (Médico y Veterinario)

Fiebre de garrapata Colorada, encefalosis equina Lebombo (en humanos), lengua azul

Familia Retrovirus**Sub-Familia:**

- 5 **Oncorivirinal: (Veterinario) (Médico) virus de leucemia felina, HTLVI y HTLVII**
- Lentivirinal: (Médico y Veterinario) HIV, virus de inmunodeficiencia felina, infecciones equinas, virus de anemia Spumavirinal**

10 **Familia Papovavirus****Sub-Familia:**

Polyomavirus: (Médico) virus BKU y JCU

Sub-Familia:

- 15 **Papiloma virus: (Médico) muchos tipos virales asociados con cánceres o progresión maligna del papiloma.**

Adenovirus (Médico)

EX AD7, ARD., O.B. -- causa de enfermedad respiratoria -- algunos adenovirus tales como 275 causan enteritis

20

Familia Parvovirus (Veterinario)

Parvovirus Felino: causa de enteritis felina

Panleucopeniavirus Felino

Parvovirus Canino

- 25 **Parvovirus Porcino**

Familia Herpesvirus

Sub-Familia: alfa herpesviridae

Genero: virus Simplex (Médico)

- 5
- HSVI (Genbank X14112, NC001806), HSVII(NC001798)
- Varicellovinis: (Médico Veterinario) pseudorabias - varicela
zoster

Sub-Family-beta herpesviridae

Genero: Cytomegalovirus (Médico)

- 10
- HCMV
- Muromegalovirus

Sub-Familia. Gamma herpesviridae

Genero: Lymphocryptovirus (Médico)

-
- EBV- (linfo de Burkitts)
- 15
- Rhadinovirus

Familia Poxvirus

Sub-Family: Chordopoxviridae (Médico-Veterinario)

Genero: Variola. (viruela)

- 20
- Vaccinia (vacuna)
- Parapoxivirus-Veterinario
- Auipoxvirus-Veterinario
- Capripoxvirus
- Leporipoxvirus
- 25
- Suipoxvirus

Sub-Familia: Entomopoxviridae

Familia Hepadnavirus

virus de Hepatitis B

- 5 No clasificado virus de Hepatitis delta

Tabla 2

Patogenos Bacteriales

- Los patogenos cocos gram-positivo incluyen: pneumococo; estafilococo; y
10 estreptococo. Los patogenos cocos gram-negativo incluyen: meningococo; y gonococo.

- Los bacilos gram-negativo entericos patogenicos incluyen: enterobacteriaceae
; pseudomonas, acinetobacteria de la andeikenella, melioidosis;, salmonella;
15 shigellosis; hemophilus; chancroide; brucellosis; tularemia; yersinia (pasteurella); streptobacillus mortiformis y spirillum; listeria monocytogenes; erysipelotheix rhusiopathiae; difteria, colera, antrax; donovanosis (granuloma inguinal); y bartonellosis.

- 20 Bacterias anaerobicas patogenicas incluyen: tetanos; botulismo; otras clostridias; tuberculosis; lepra; y otras micobacterias. Enfermedades patogenicas espiroquetales incluyen: sífilis; -treponematosas: frambesia, pinta y sífilis endemica; y leptospirosis.

- 25 Otras infecciones causadas por bacterias patogenas más altas y hongos

patogenicos incluyen: actinomicosis;. nocardiosis; cryptococcosis, blastomycosis, histoplasmosis y coccidioidomycosis; candidiasis, aspergilosis, y mucormycosis; sporotrichosis; paracoccidioidomycosis, petriellidiosis, torulopsosis, mycetoma, y chromomycosis; y dermatophytosis.

5

Las infecciones Rickettsial incluyen rickettsial y rickettsioses.

Ejemplos de infecciones de mycoplasma y clamidia incluyen: micoplasma pneumoniae; lymphogranuloma venéreo; psittacosis; e infecciones clamidiales perinatales.

10

Eucariotes Patogenicos

Protozoanos y helminticos patógenicos e infecciones de tal modo incluyen: amebiasis; malaria; leishmaniasis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; pneumocistis de carinii; babesiosis; giardiasis; triquinosis; filariasis; schistosomiasis; nematodos; trematodos o flukes; e infecciones por cestodeo (solitaria).

15

REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión no inmunogénica que
5 comprende un péptido de señal sin-IL-15 enlazado a una proteína IL-15 o a un fragmento funcional del mismo, o una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión inmunogénica que comprende un péptido de señal sin-IL-15 enlazado a una proteína IL-15 o a un fragmento funcional del mismo, en donde el péptido
10 de señal sin-IL-15 es de un gen que es de la misma especie que el IL-15.
2. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el péptido de señal sin-IL-15 es un péptido de señal IgE.
- 15 3. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión consiste de un péptido de señal sin-IL-15 enlazado a una proteína IL-15 o un fragmento funcional de la misma.
4. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-3, en
20 donde dicha proteína IL-15 o un fragmento funcional de la misma es proteína IL-15 libre del péptido de señal IL-15 o un fragmento funcional de proteína IL-15 libre del péptido de señal IL-15.
5. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-4, en
25 donde la secuencia que codifica la proteína IL-15 o un fragmento funcional de

la misma es libre de la región IL-15 Kozak y/o la región IL-15 5' no traducida y/o de la región IL-15 3' no traducida.

6. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5, que además comprende una secuencia nucleotida que codifica CD40L o un fragmento funcional de la misma.

7. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IL-15 o un fragmento funcional de la misma y una secuencia nucleotida que codifica CD40L o un fragmento funcional del mismo.

8. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-7, que además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno.

9. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde dicho inmunogeno es un antígeno patógeno, un antígeno asociado a cáncer o un antígeno enlazado a células asociadas con enfermedades autoinmunes.

20

10. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde dicho inmunogeno es un antígeno patógeno.

11. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 10, en donde dicho antígeno patógeno es de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de VIH, VSH, VCH y VNW.
- 5 12. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-11, en donde las secuencias que codifican IL-15 están libres del péptido de señal IL-15.
- 10 13. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-12, en donde las secuencias que codifican IL-15 están libres de la región IL-15 Kozak y/o la región IL-15 5' no traducida y/o la región IL-15 3' no traducida.
14. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-13, en donde dicha molécula aislada de ácido nucleico es un plásmido.
- 15 15. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-13 es incorporada en un vector viral.
16. Una composición que comprende una molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-15, que además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno.
- 20 17. La composición de la reivindicación 16, en donde dicho inmunógeno es un antígeno patógeno, un antígeno asociado a cáncer o un antígeno enlazado a células asociadas con enfermedades autoinmunes.
- 25

18. La composición de la reivindicación 17, en donde dicho inmunogeno es un antígeno patógeno.
- 5 19. La composición de la reivindicación 18, en donde dicho antígeno patógeno es de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de VIH, VSH, VCH y VNW.
- 10 20. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-19 y una molécula de ácido nucleico que además comprende una secuencia nucleotida que codifica CD40L.
- 15 21. Una composición farmacéutica inyectable que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-15 o la composición de las reivindicaciones 16-20.
22. Una vacuna recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-13.
- 20 23. La vacuna recombinante de la reivindicación 22, en donde dicha vacuna recombinante es una vacuna de vacunas recombinante.
24. Un patógeno vivo atenuado que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-13.

25. Una proteína de fusión no-inmunogénica que comprende una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una secuencia de proteína IL-15 o a una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una secuencia de proteína IL-15, en donde la secuencia de señal sin-IL-15 es de la misma especie que la secuencia de proteína IL-15.
26. La proteína de fusión de la reivindicación 25, en donde la secuencia de señal sin-IL-15 es una secuencia de señal IgE.
27. La proteína de fusión de la reivindicación 25 o la 26, que consiste de una secuencia de señal sin-IL-15 enlazada a una secuencia de proteína IL-15.
28. La proteína de fusión de las reivindicaciones 25-27, en donde la secuencia de proteína IL-15 está libre de la secuencia de señal IL-15.
29. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína IL-15 y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotida que codifica la proteína CD40L.
30. La composición de la reivindicación 29 que además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunogeno.

31. La composición de las reivindicaciones 29 o 30, en donde dicho inmunogeno es un antígeno patógeno, un antígeno asociado con cáncer o un antígeno enlazado a células asociadas con enfermedades auto-inmunes.
- 5 32. La composición de la reivindicación 31, en donde dicho inmunogeno es un antígeno patógeno.
33. La composición de la reivindicación 32, en donde dicho inmunogeno es un antígeno patógeno de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de
- 10 VIH, VSH, VCH y VNW.
34. La composición de las reivindicaciones 29-33, en donde las moléculas aisladas de ácido nucleico son plásmidos.
- 15 35. Un método para modular una respuesta inmune en un individuo que comprende la administración a dicho individuo de una composición de las reivindicaciones 58 o 63.
36. Un método para inducir una respuesta inmune en un individuo contra un
- 20 inmunogeno que comprende la administración a dicho individuo de una composición de las reivindicaciones 59, 62 o 64-67.
37. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que consiste de un
- 25 péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE, en donde el

péptido de señal IgE y las secuencias de proteína sin-IgE se derivan de la misma especie de animal.

38. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia
5 de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE, en donde la proteína sin-IgE es una enzima o un fragmento funcional de la misma.

39. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia
10 de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE, en donde la proteína sin-IgE es una proteína inmunomodulante o un fragmento funcional de la misma.

15 40. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 39, en donde la proteína de fusión consiste de un péptido de señal IgE enlazado a una proteína inmunomodulante o un fragmento funcional de la misma.

41. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 39-40, en
20 donde el péptido de señal IgE y las secuencias de proteína sin-IgE se derivan de la misma especie animal.

42. La molécula aislada de ácido nucleico de las reivindicaciones 39-41, en donde dicha molécula aislada de ácido nucleico es un plásmido.

43. La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 39-41, incorporada en un vector viral.
44. Una composición farmacéutica inyectable que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 39-41.
45. Una vacuna recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 39-41.
46. Un patógeno vivo atenuado que comprende las moléculas de ácido nucleico de las reivindicaciones 39-41.
47. Una proteína de fusión que comprende un péptido de señal IgE enlazado a una proteína sin-IgE, en donde el péptido de señal IgE y la proteína sin-IgE son derivados de la misma especie animal.
48. Una proteína de fusión que comprende un péptido de señal IgE enlazado a una proteína sin-IgE, en donde la proteína sin-IgE es una enzima o un fragmento funcional de la misma.
49. La proteína de fusión de la reivindicación 47, en donde la secuencia de proteína sin-IgE es una proteína inmunomodulante o un fragmento funcional de la misma.

50. La proteína de fusión de la reivindicación 47 que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a una proteína inmunomodulante o un fragmento funcional de la misma.
- 5 51. La proteína de fusión de las reivindicaciones 49-50, en donde el péptido de señal IgE y la proteína sin-IgE se derivan de la misma especie animal.
52. Un cultivo de células in vitro que comprende células que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido
10 nucleico que codifica una proteína de fusión que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de proteína sin-IgE, en donde la secuencia de ácido nucleico está operablemente enlazada a elementos reguladores requeridos para la expresión en dichas células.
- 15 53. Un método para preparar una proteína sin-IgE que comprende cultivar células que comprende células que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que consiste de un péptido de señal IgE enlazado a secuencias de
20 proteína sin-IgE, en donde la secuencia de ácido nucleico está operablemente enlazada a elementos reguladores requeridos para la expresión en dichas células bajo la condición necesaria para la expresión de la proteína de fusión por un periodo suficiente para que dichas células expresen dicha proteína de fusión.

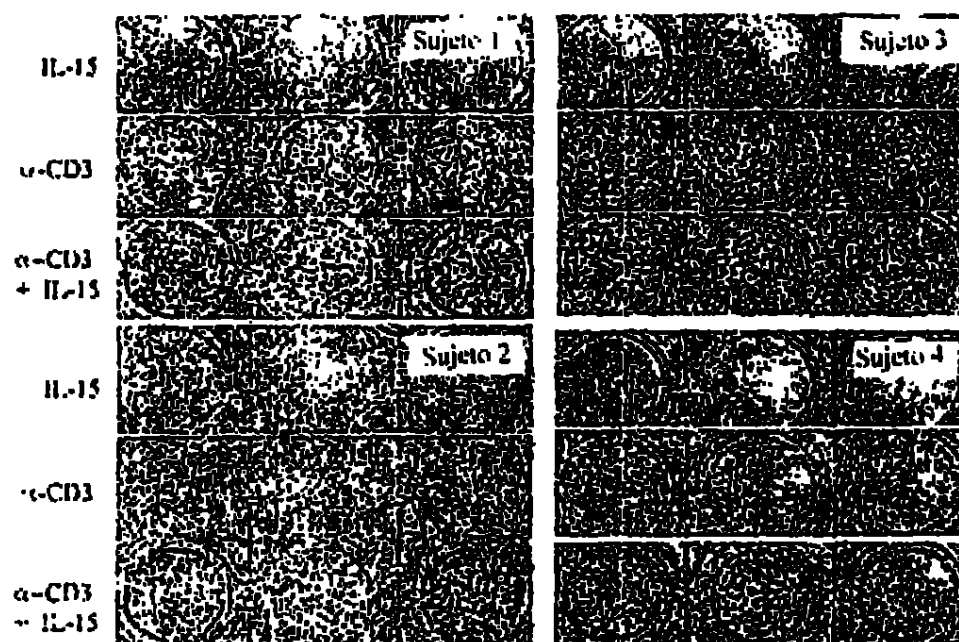


Figura 1

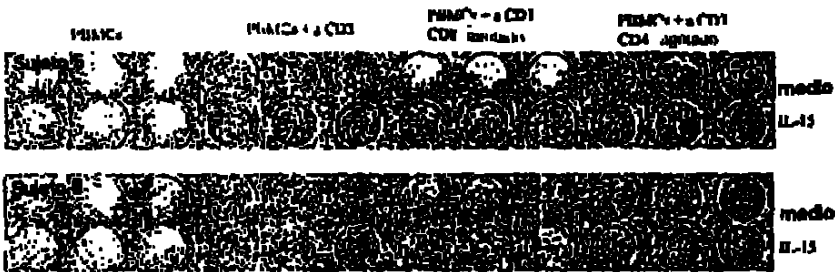


Figura 2

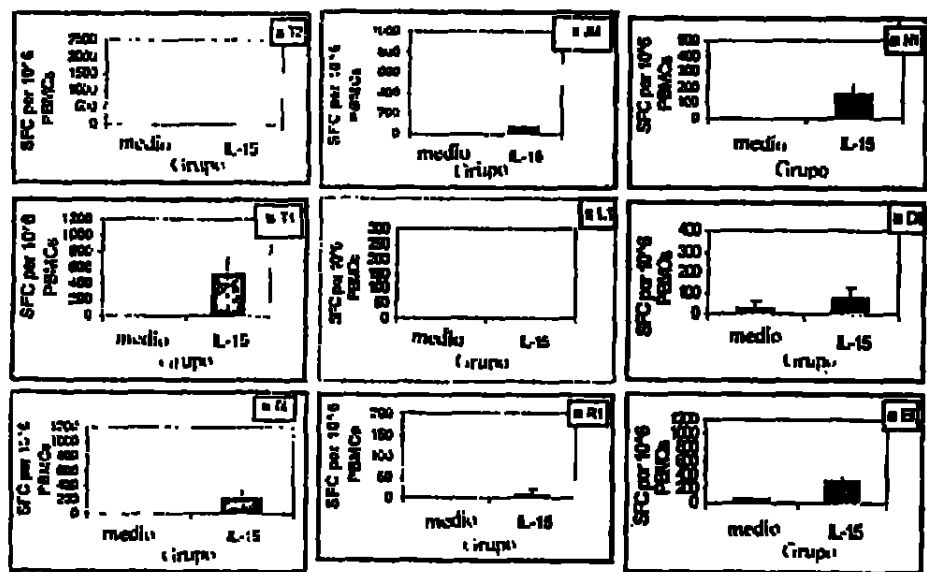


Figura 3A

5

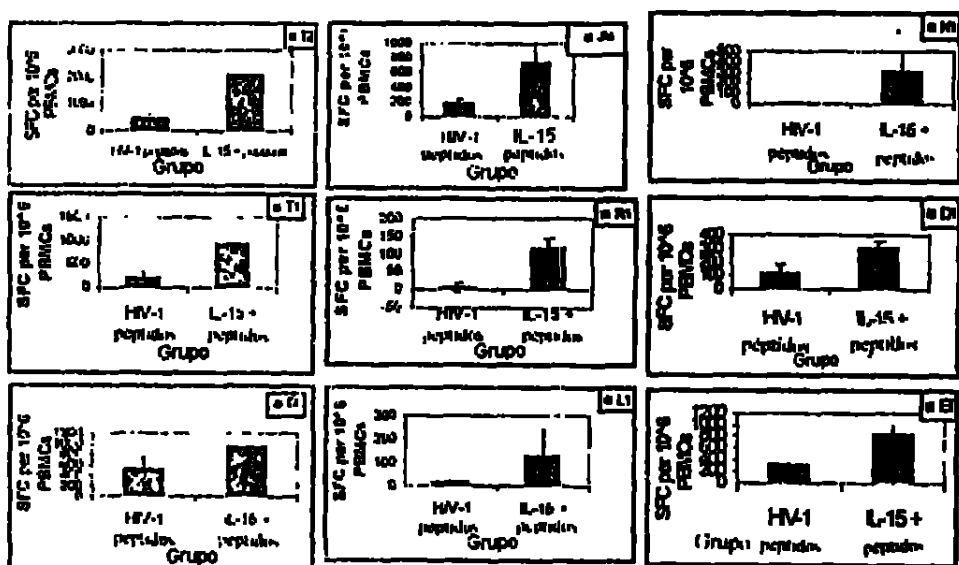


Figura 3B

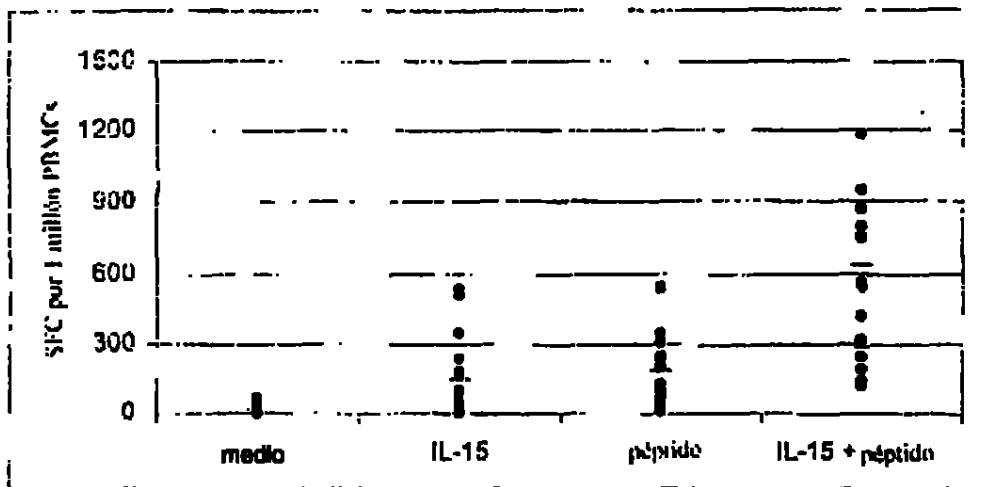


Figura 3C

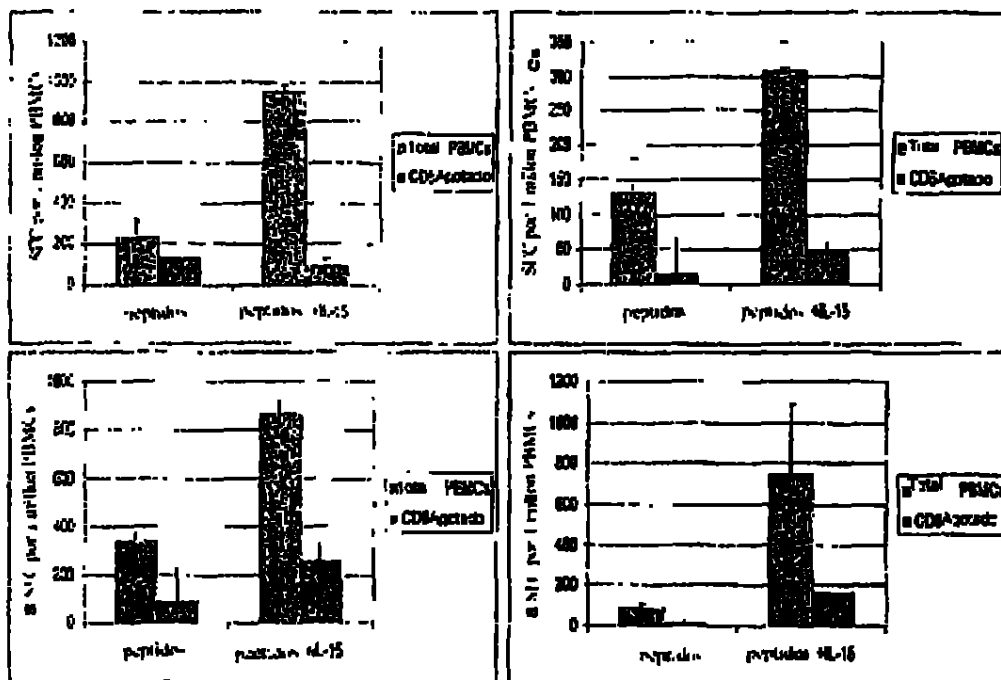


Figura 3D

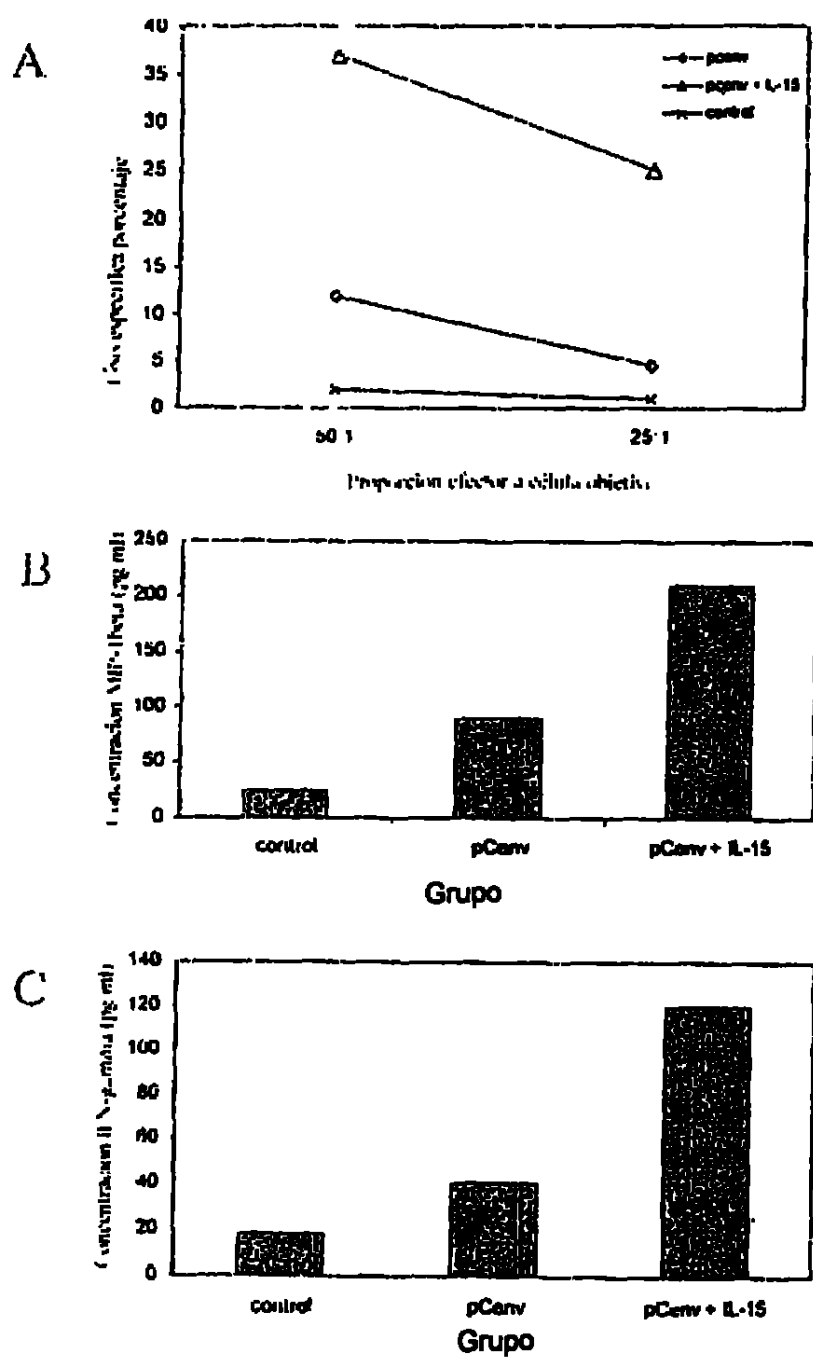


Figura 4

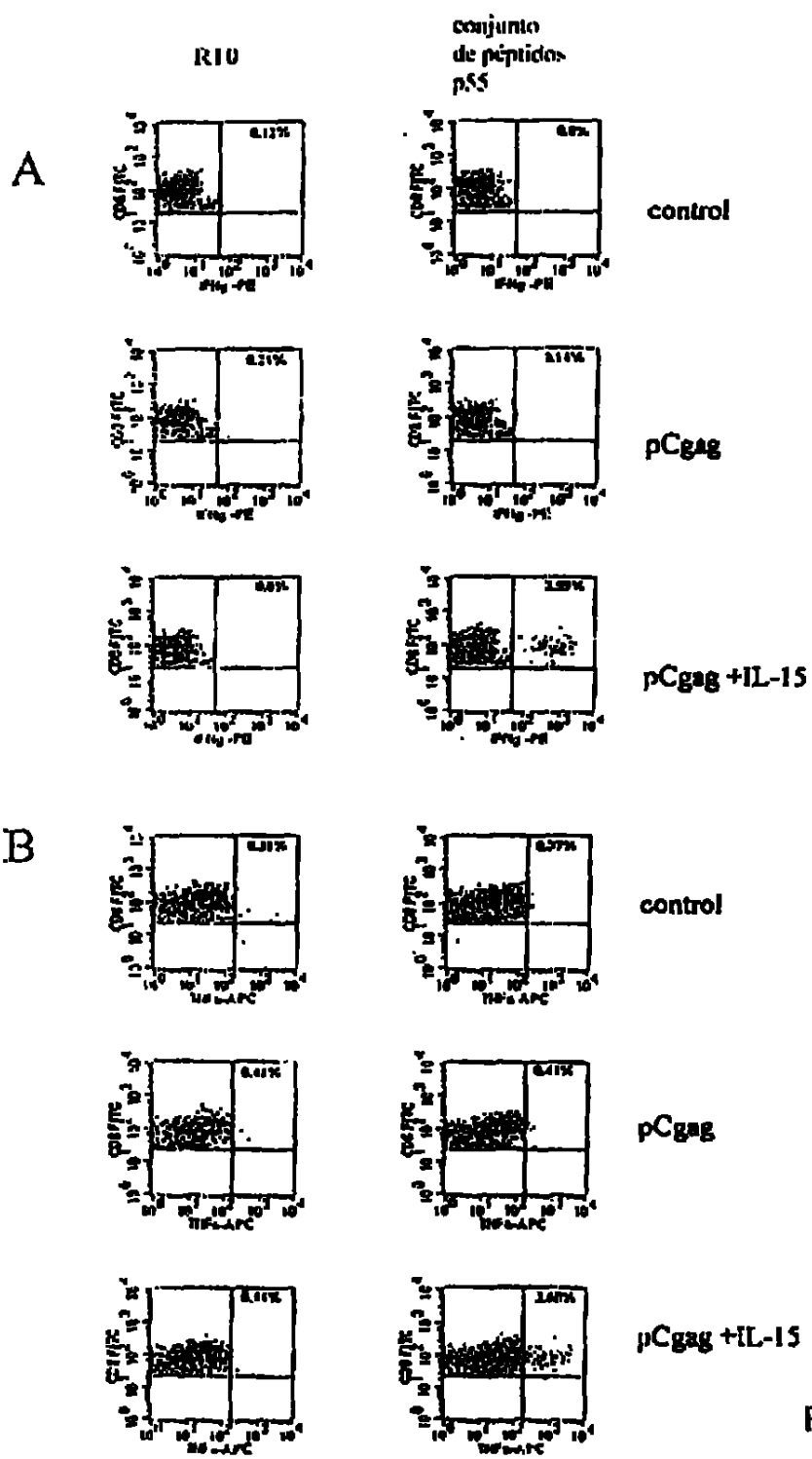


Figura 5

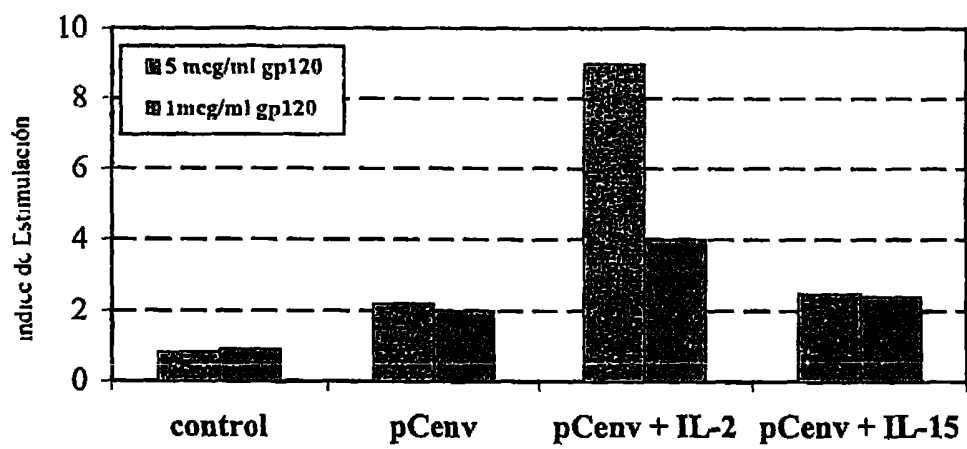


Figura 6

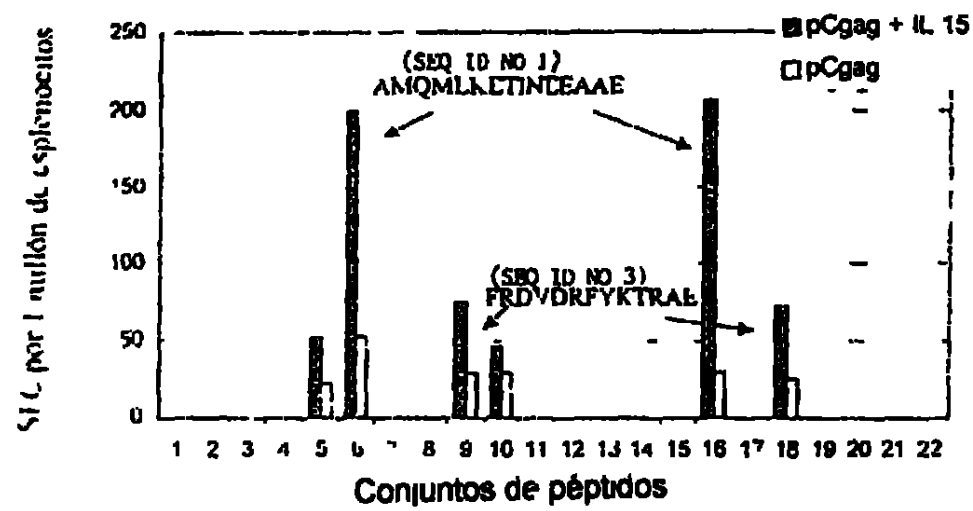
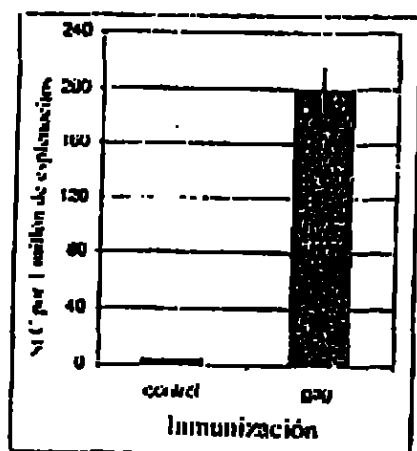
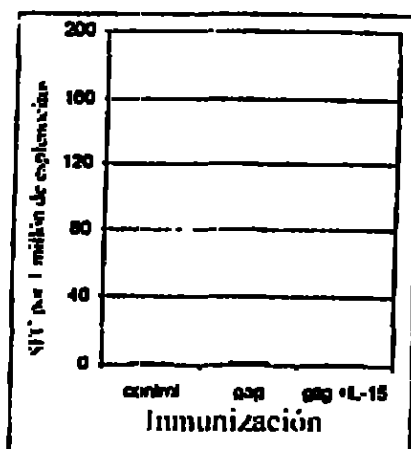


Figura 7

A



B



C

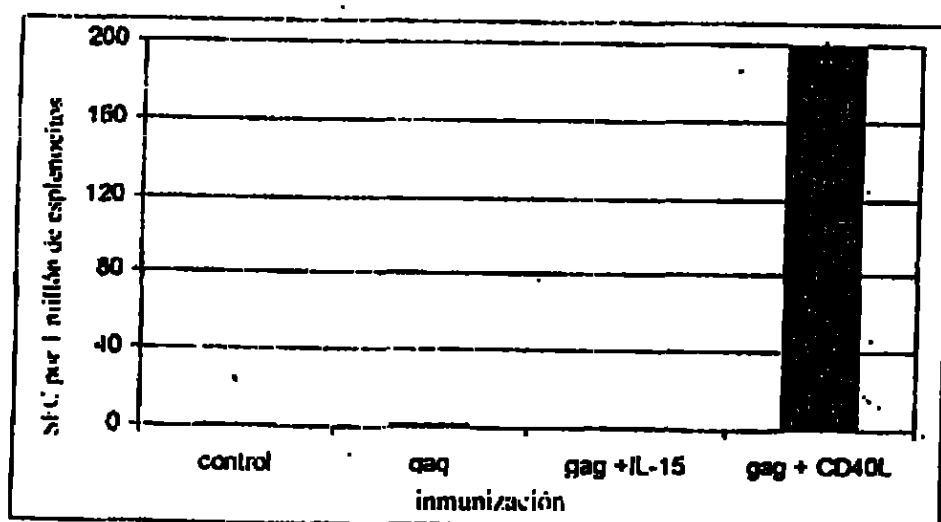


Figura 8

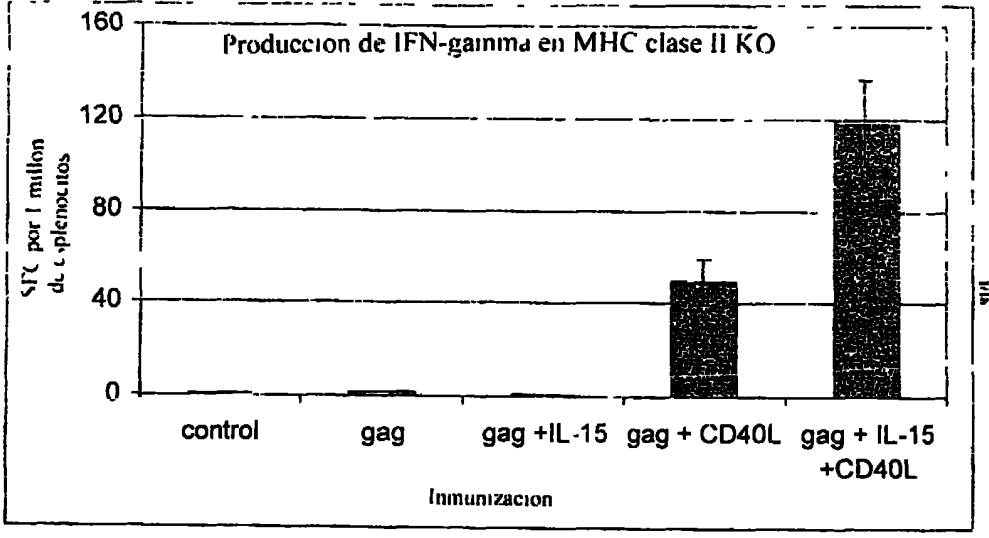


Figura 9

Estrategia para incrementar la Expresión de IL-15 a través de la
Optimización de Constructor de ADN IL-15 para la inmunización

- Los Iniciadores se diseñaron para amplificar IL-15 desde el comienzo de un péptido señal, así los AUGS inhibitorios contenidos arriba no están presentes en el mensaje final de IL-15.
- Los iniciadores son diseñados para incluir un contexto KOZAK fuerte (GCCGCCACC).
- Remoción del elemento regulatorio C- Terminal negativo mediante el uso de diseño PCR con iniciador anti-sentido

Nombre del iniciador	Sentido/antisentido	Secuencia 5 a 3
IL-15 humano(LSP)	Sentido (SEQ ID NO 4)	GCCCCCGTCGACGCCGCCACCATGAGAAATTCGAAACCACATTTGAG
	Antisentido (SEQ ID NO 5)	ATCGGGCTCGAGTCAAGAAGTGTTGATGAACAATTGG
Macaco IL-15 (LSP)	Sentido(SEQ ID NO 4)	GCCCCCGTCGACGCCGCCACCATGAGAAATTCGAAACCACATTTGAG
	Antisentido (SEQ ID NO 5)	ATCGGGCTCGAGTCAAGAAGTGTTGATGAACAATTGG
IL-15 humano (SSP)	Sentido (SEQ ID NO 6)	GCCCCCGGTACCGCCGCCACCATGGTATTGGGAACCAT
	Antisentido (SEQ ID NO 7)	ATCGGGGGATCCTCAAGAAGTGTTGATGAACAT
Leyenda: sitio de restricción, KOZAK, CODON de PARTIDA, DE DETENCION		

FIGURA 10

212

Estrategia para Incrementar la Expresión de IL-15 mediante el reemplazo del péptido de señal de 48 amino ácidos (LSP) con IgE Líder

- ◆ Los iniciadores sentidos se diseñaron para comenzar despues de la ISP de 48 aa, en tanto que el iniciador antisentido amplifica desde el sitio de detención
- ◆ Los iniciadores son diseñados para incluir un contexto KOZAK fuerte (GCCGCCACC)
- ◆ El iniciador de sentido es diseñado para contener la secuencia para la secuencia líder IgE mas un sitio de inicio ATG

Nombre del Iniciador	Sentido/antisentido	Secuencia 5 a 3
IL-15 humano(IgE)	Sentido (SEQ ID NO-8)	GCCCCCGAATTGCCGCCACCATGGATTGGATTGGACTTGGATCTTATTTT
	(SEQ ID NO-9)	AGTTGCTGCTGCTACTAGAGTTCATTCTAACTGGGTGAATGTAATAAGT
Macaco IL-15 (IgE)	Antisentido(SEQ ID NO-8)	ATCGGGCTCGAGTCAAGAAGTGTTGATGAACATTTGG
	sentido (SEQ ID NO 8)	GCCCCCGAATTGCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATCTTATTTT.
	(SEQ ID NO- 9)	AGTTGCTGCTGCTACTAGAGTTCATTCTAACTGGGTGAATGTAATAAGT
	Antisentido (SEQ ID NO- 5)	ATCGGGCTCGAGTCAAGAAGTGTTGATGAACATTTGG
Leyenda. sitio de restricción, KOZAK, INICIO , CODON, de detención		

FIGURA 11

245

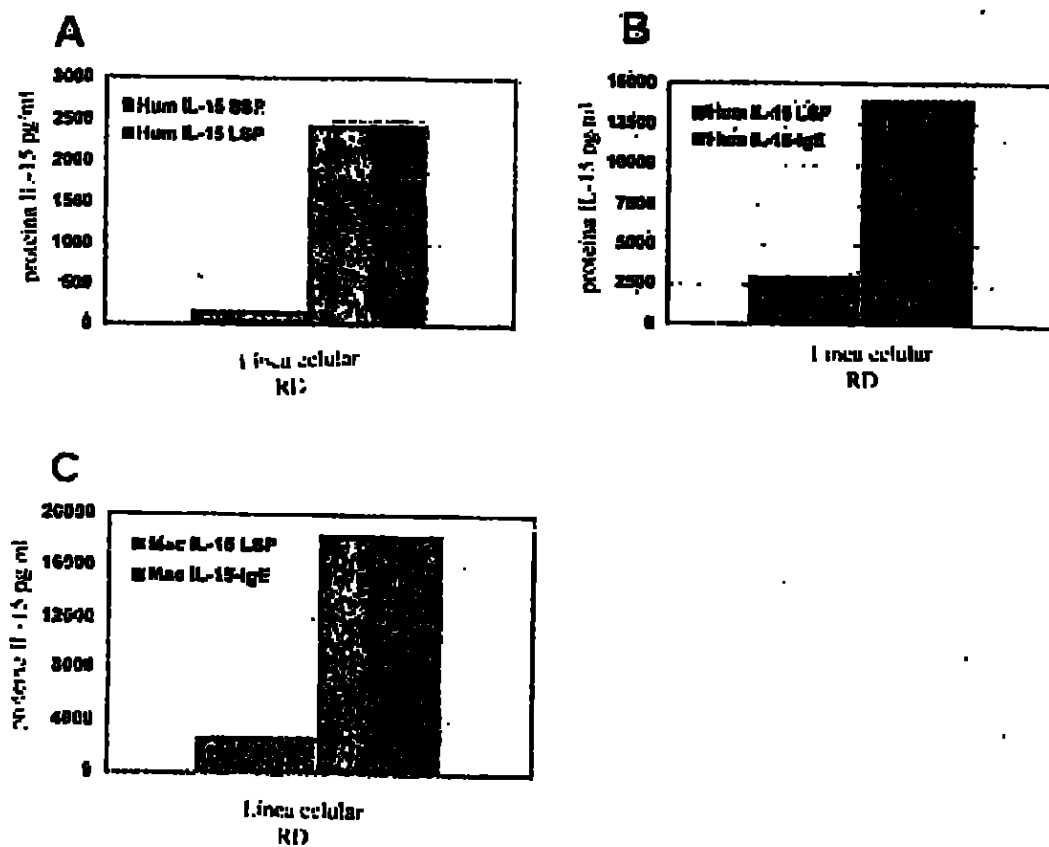
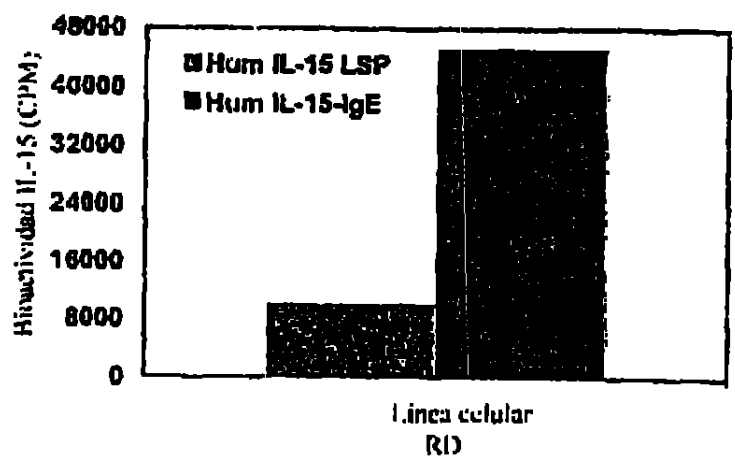


Figura 12

A



B

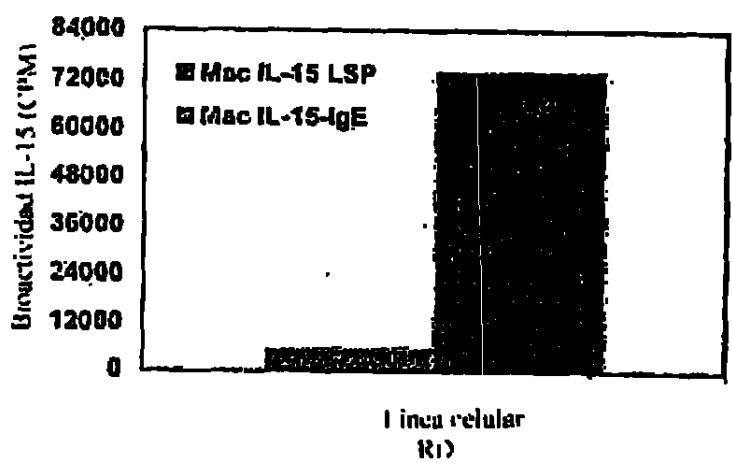


Figura 13

Cronograma de Inmunización

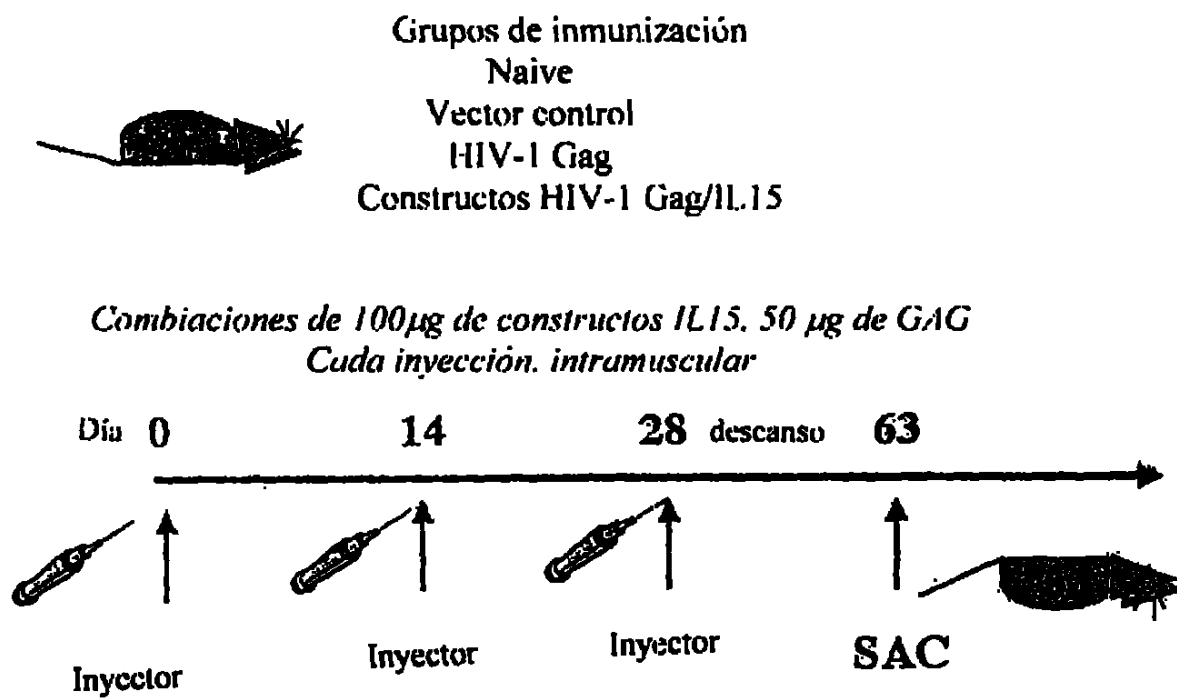


Figura 14

216

Reestimulación de la producción del antígeno IFN- γ específico 5 semanas después
de la tercera inmunización de ratones Balb/C con HIV-1 Gag
Efecto de constructos IL-15

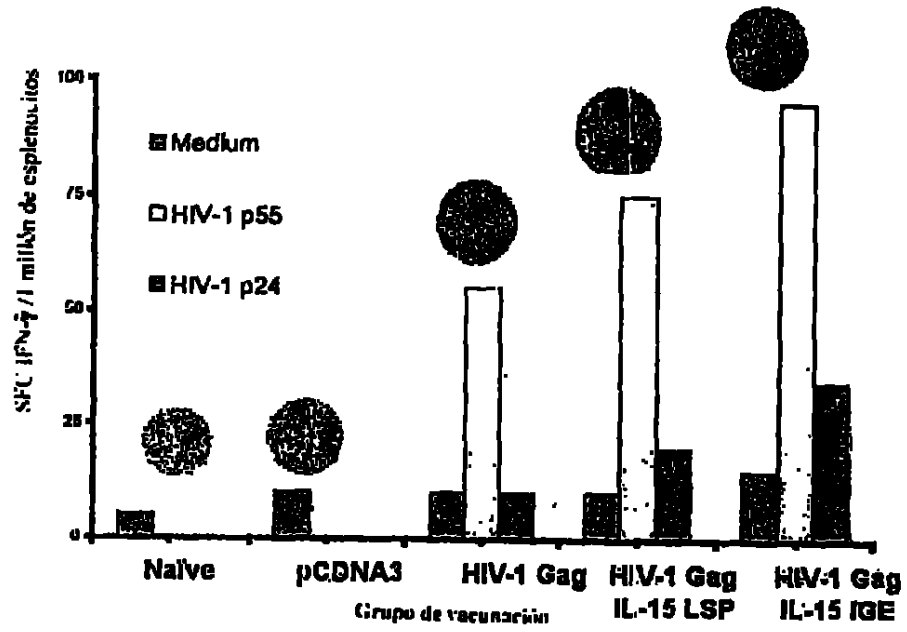
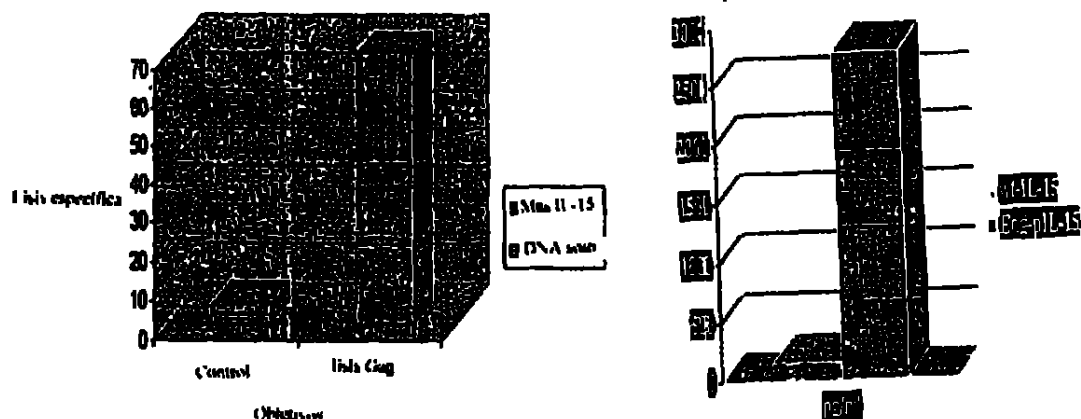


Figura 15

219

Una vacuna de plásmido II.-15 diseñada,
(KOZAK, AUG'S removidos, UTR'S removidos y otros-30-50X mejor expresión)
realiza la respuesta CTL in vivo ratones fueron inmunizados con VIH-Igag que expresa ADN.



Grabstein et al. (1994) *Science* 264:968-969, Barnford et al., 1998) *PNAS* 93:2887-2902
Barnford et al., (1998) *J. Immunol* 160:4418-4426, Kozak et al. (1991) *J. Cell Biol* 115:887-903
Figura 16

Listado de secuencias <110>

Trustees de la Universidad de Pensilvania

<120> Secuencias ácido nucleico codificante y composiciones que comprenden el péptido señal de IgE y/o IL-15 y métodos para el uso de los mismos

<130> UPAP0020-500

<150> US 60/478,205 <151>
2003-06-13

<150> US 60/478,210 <151>
2003-06-13

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<212> 14
PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 1

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Met Glu Glu Ala Ala Glu
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 2

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 3

Phe Arg Asp Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

<210> 4

<211> 47

<212> DNA

1 5 10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> iniciador del oligonucleò tido

<400> 4

gccccgctcg acgccgccac catgagaatt tcgaaccac attgag

47

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> iniciador del oligonucleò tido

<400> 5

atcgggctcg agtcaagaag tttgatgaa cattgg

37

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> iniciador del oligonucleò tido

<400> 6

gccccgcta ccgccgccac catgtattg ggaaccata

39

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> iniciador del oligonucleò tido

<400> 7

atcggggat cctcaagaag tttgatgaa cat

33

<210> 8
<211> 47
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> iniciador del oligonucleótido

<400> 8
gcccccgaa tcccgccac catggattgg acttggatct tatitit

47

<210> 9
<211> 49
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> iniciador del oligonucleótido
<400> 9
agttgctgct gctactagag ttcaattctta ctgggtgaat gtaataagt

49

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 80
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 204
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

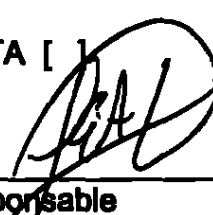
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha Dic 22 de 2005

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@alc.gov.co
www.alc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

225
222

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

REFERENCIA	Radicación No.	5 129156
	Solicitud internacional	US2004/018962
	Fecha inicio fase nacional	13/01/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3815

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 31 MAR. 2006
adpal