



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 609**

51 Int. Cl.:
A61K 39/285 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03732280 .7**
86 Fecha de presentación : **16.04.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1420822**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Virus Vaccinia Ankara Modificado para la vacunación de neonatos.**

30 Prioridad: **19.04.2002 DK 2002 00590**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2008

73 Titular/es: **Bavarian Nordic A/S**
Bogeskovvej 9
3490 Kvistgaard, DK

72 Inventor/es: **Chaplin, Paul;**
Suter, Mark;
Ackermann, Mathias;
Franchini, Marco;
Vollstedt, Sabine y
Hefti, Hans, Peter

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 288 609 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus Vaccinia Ankara Modificado para la vacunación de neonatos.

5 La invención se refiere al uso de un virus para la preparación de un medicamento destinado a la vacunación o el tratamiento de un animal neonato, incluido un ser humano, según el cual el virus es capaz de infectar las células del animal neonato, incluido un ser humano, pero es incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en el animal neonato, incluido un ser humano. El virus es un Virus Vaccinia Ankara Modificado.

10 La invención se refiere al uso de MVA según se define precedentemente para aumentar el nivel de los factores que activan las células dendríticas o sus células precursoras y/o para aumentar el número de células dendríticas o de sus células precursoras y/o para aumentar la producción y/o el contenido celular de un interferón (IFN) o de IL-12.

Antecedentes de la invención

15 El ambiente natural de los animales y los seres humanos contiene una variedad grande de agentes infecciosos como virus, bacterias u hongos. Muchos de estos agentes infecciosos pueden causar enfermedades en los huéspedes infectados. En circunstancias normales, el huésped infectado se recupera de la enfermedad inducida por el agente infeccioso después de un cierto período. Esta recuperación se debe al sistema inmunitario de un animal o un ser humano.

20 El sistema inmunitario es la parte del organismo humano o del animal que es responsable de eliminar el agente infeccioso. La respuesta inmunitaria se divide en una reacción específica y una inespecífica (innata) aunque ambas cooperan estrechamente. La respuesta inmunitaria inespecífica es la defensa inmediata contra una amplia diversidad de sustancias extrañas y agentes infecciosos. En la respuesta inmunitaria innata contra los virus, el interferón (IFN)- α y el IFN- β son absolutamente esenciales para controlar la replicación vírica inicial y para activar los linfocitos citotóxicos naturales (NK) para la eliminación inmediata de las células infectadas. Los patógenos bacterianos o parasitarios intracelulares inducen la IL-12 que expresa al IFN- γ en los linfocitos NK y/o algunos subconjuntos de linfocitos T. Los linfocitos NK activados por el IFN- γ pueden entonces eliminar los patógenos intracelulares. Por otra parte, el IFN- γ también activa los macrófagos y les permite eliminar los patógenos internalizados.

25 Con mucho, la fuente más rica de IFN- α/β por tipo de célula son las células dendríticas (CD), una población especializada de células distribuida estratégicamente en todo el organismo. Las células dendríticas plasmacitoides CD11c⁺ CD8⁺ DC están entre las mejores productoras de IFN- α/β . Las CD8⁺ DC que son infectadas por agentes patógenos intracelulares no víricos son las células cruciales capaces de secretar IL-12 esencial para los primeros pasos de la defensa inmunitaria.

30 Se puede inducir una respuesta inmunitaria específica contra una sustancia extraña particular (antígeno) después de una fase lag, cuando el organismo es provocado con esta sustancia por primera vez. La iniciación de la respuesta inmunitaria específica también es coordinada por las CD. Hay un tránsito constante de estas células desde la periferia a los órganos linfoides secundarios, los ganglios linfáticos o el bazo donde recirculan los linfocitos T y B vírgenes. El antígeno que es transportado por las CD a estos órganos permite la activación de los linfocitos B y T vírgenes para convertirse en linfocitos T y B efectoras. Con este fin, las CD no sólo transportan el antígeno, sino que la plasticidad del reconocimiento del patógeno permite la activación de diferentes genes en las CD y de esta forma una sensibilización ajustada de los linfocitos T por el patógeno.

35 La respuesta inmunitaria específica es sumamente eficaz y es responsable de que un individuo que se recupera de una infección específica esté protegido contra esa infección específica. Por lo tanto, una segunda infección con el mismo agente infeccioso o uno muy similar causa síntomas mucho más leves o no causa ningún síntoma en absoluto, porque ya hay una "inmunidad específica preexistente" contra este agente. Dicha inmunidad y la memoria inmunológica, respectivamente, persisten durante mucho tiempo, en algunos casos incluso durante toda la vida. En consecuencia, se puede usar la inducción de una memoria inmunológica para la vacunación, es decir para proteger a un individuo contra la infección con un patógeno específico.

40 A los efectos de la vacunación, se provoca al sistema inmunitario con una vacuna que en sí misma es menos perjudicial que el agente patógeno contra el cual se va a inducir una respuesta inmunitaria. La vacuna comprende o expresa epítomos que se encuentran en el agente o son expresados por el agente contra el cual se hace la vacunación. El organismo, por lo tanto, es inmunizado contra el agente que contiene el epítomo que forma parte de la vacuna.

45 Las vacunas típicas son virus atenuados o inactivados (por ejemplo, las vacunas antipoliomielítica o antivariólica), proteínas recombinantes (por ejemplo, la proteína S del virus de la hepatitis B recombinante), toxinas bacterianas inactivadas por calor (la toxina del *Clostridium tetani*) o polisacáridos de la pared de la cápsula bacteriana (*Streptococcus pneumoniae*).

50 Puesto que las enfermedades infecciosas pueden provocar afecciones muy críticas en los recién nacidos y lactantes, existe el interés de vacunar a los niños o los animales recién nacidos lo antes posible. Los ejemplos de las afecciones contra las cuales es aconsejable la vacunación son las infecciones causadas por poxvirus, incluida la viruela. Sin embargo, los intentos por vacunar con éxito a recién nacidos son obstaculizados por el hecho de que el sistema inmu-

nitario de los mamíferos recién nacidos todavía no está maduro. Se piensa que el sistema inmunitario de los lactantes y otros mamíferos neonatos madura gradualmente durante un cierto período. Para los seres humanos la maduración ocurre durante el primer año de vida. Esta es la razón por la que el grupo de edad neonatal queda expuesto a diversas infecciones durante este primer año (Gans *et al.*, J. Am. Med. Assoc. (1998) 280, 527-532). Más particularmente, los lactantes neonatos tienen disfunción de los linfocitos B, deficiencias en la presentación primaria de antígenos por las células dendríticas y proliferación limitada de linfocitos T (Gans *et al.*, J. Am. Med. Assoc. (1998) 280, 527-532). Poco después del nacimiento los niveles de linfocitos T en el bazo son 1.000 veces menores que en los adultos. Para lograr al menos una inmunización débil se sugirió el uso de cualquier virus que se replique o de formulaciones que comprendan un adyuvante para la inmunización. Sin embargo, con virus de replicación siempre se corre el riesgo de que el sistema inmunitario inmaduro pueda ser sobrepasado por la infección vírica o las vacunas de virus vivo dado que los linfocitos T son necesarios para la depuración de los virus (Hassett *et al.*, J. Virol. (1997) 71, 7.881-7.888). Puesto que en los neonatos hay una producción reducida de citocinas por los linfocitos T cooperadores Th-1, la respuesta de los lactantes es predominantemente por Th-2. En consecuencia, no se reclutan los linfocitos T citotóxicos y no se logra depuración de los virus.

La situación en los animales mamíferos es muy similar a la situación en los seres humanos, es decir el sistema inmunitario después del nacimiento todavía no está maduro. En los ratones recién nacidos, el número de linfocitos T CD4+ esplénicos es 80.000 veces menor y el de los linfocitos T CD8+ 1.000 veces menor que en los bazos de los adultos. Además, el sistema de producción de interferón (IFN) en estos ratones está inmaduro. Por consiguiente, los ratones neonatos no pueden controlar eficazmente la reproducción de los patógenos intracelulares mediante el IFN en el sitio de la infección. Además, el número bajo de células inmunitarias y posiblemente un estadio de activación inadecuado de dichas células son demasiado limitados para hacer frente a los patógenos en rápido aumento o los virus que se replican utilizados para la vacunación.

Kovarik *et al.* (Virology (2001) 285, 12-20) divulgan la inducción de respuestas de Th1 y linfocitos T citotóxicos semejantes a la del anticuerpo del adulto en un modelo de inmunización murina en edad temprana utilizando la cepa NYVAC(K1L) basada en el virus vaccinia (de la variolovacuna) derivada de la cepa Copenhagen. Sin embargo, dicha cepa se replica en las células humanas.

Debido al riesgo asociado a las vacunas de virus vivo no se recomienda vacunar a los animales neonatos, incluidos los seres humanos, con virus que se replican. Por ejemplo, se recomienda no vacunar a los recién nacidos contra la viruela con las cepas de variolavirus utilizadas hasta la erradicación de la viruela, como las cepas Elstee, Copenhagen y NYCBH. Según las recomendaciones recientes en los EE.UU., los bebés menores de 12 meses de edad no deben recibir las vacunas antivariólicas comercializadas hasta el presente.

La vacunación de los neonatos con formulaciones que comprenden un adyuvante tiene la desventaja de que se introducen en el organismo varias sustancias nocivas. Por lo tanto, una vacunación en neonatos humanos sólo se hace en casos de emergencia, por ejemplo, en el caso de infección por el virus de la hepatitis B.

En resumen, se debe advertir que el sistema inmunitario no está maduro al nacer. Puesto que la vacunación con virus competentes para la replicación o formulaciones que comprenden un adyuvante tiene desventajas importantes, los lactantes no se vacunan antes de los 2 meses de edad en Alemania (Empfehlung der Ständigen Impfkommission STICO, 2001) o 6 semanas en los EE.UU (ACIP "Recommended Childhood Immunization Schedule, United States").

El retraso en el desarrollo del sistema inmunitario es compensado en parte por la transferencia de los anticuerpos maternos desde la madre al lactante durante el embarazo o a través de la lactancia materna. Sin embargo, no todos los lactantes son amamantados por diversas razones. De este modo, hay un período muy crítico de aproximadamente 6 a 8 semanas en los seres humanos durante el cual el lactante que tiene un sistema inmunitario inmaduro y por lo tanto no plenamente funcional no recibe anticuerpos maternos y durante el cual una vacunación generalmente no es exitosa o es demasiado peligrosa.

La situación es muy similar en los animales mamíferos, en particular para los animales económicamente importantes como las vacas o los animales de compañía como los gatos y los perros. Para reducir los costos, la cantidad de leche que el ternero recibe de la madre es a menudo reducida drásticamente. En su lugar, el ternero recibe una mezcla de leche en polvo, alimento iniciador y concentrado específico, a veces ya en la primera semana después del nacimiento. En consecuencia, el ternero no recibe la cantidad y diversidad necesarias de anticuerpos maternos de modo que el sistema inmunitario inmaduro es muy vulnerable a las infecciones. Además, los agricultores que crían terneros y los que los engordan para la producción de carne a menudo no son los mismos. A las 4 a 6 semanas de edad se reúnen y despachan terneros de diferentes explotaciones agropecuarias a otras explotaciones agropecuarias para la producción de carne. En ese momento los anticuerpos maternos son bajos y el sistema inmunitario no está plenamente desarrollado pero los animales están expuestos a nuevos agentes infecciosos en condiciones de estrés. Esto aumenta el riesgo de infecciones que podrían evitarse mediante la vacunación. Se puede encontrar una situación similar en los pensionados de gatos y establecimientos de cría de perros donde la presión infecciosa es alta.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar medios que permitan la maduración acelerada del sistema inmunitario de los animales y los seres humanos recién nacidos.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención se encontró inesperadamente que es posible vacunar y/o tratar con seguridad y eficazmente a los animales neonatos, incluidos los seres humanos, con virus que son capaces de infectar las células del animal neonato, incluido un ser humano, pero que son incapaces de replicarse en dichas células para generar una descendencia vírica infecciosa. En particular se ha demostrado que se puede administrar MVA, en particular MVA-BN y sus derivados (ver más adelante) a los recién nacidos, sin que se observe ningún efecto perjudicial. La vacunación del animal con el virus produce una respuesta inmunitaria específica contra el virus usado para la vacunación y/o una vacunación general contra antígenos extraños y antígenos tumorales según se explica más adelante en más detalle a modo de ejemplo. Por otra parte, el MVA usado de acuerdo con la presente invención produce una inducción y/o una mejora de la maduración del sistema inmunitario, que se asocia a un aumento de la cantidad de células dendríticas y de factores como los interferones. La vacunación con MVA utilizada de acuerdo con la presente invención es posible aunque la formulación que se administre al animal no comprenda un adyuvante.

En resumen, los virus que se usan de acuerdo con la presente invención (i) provocan una respuesta inmunitaria eficaz en los neonatos, (ii) se pueden administrar sin necesidad de un adyuvante y (iii) no comportan el riesgo de sobrepasar al organismo.

De acuerdo con la presente invención el efecto protector se ejerce durante al menos 5 días, preferentemente durante al menos 7, 14 ó 28 días después de la primera vacunación.

Los virus que son “capaces de infectar las células” son virus que albergan en la superficie vírica estructuras capaces de interactuar con las células del huésped en una medida tal que el virus o al menos el genoma del virus se incorpora en la célula del huésped. Aunque el MVA utilizado de acuerdo con la presente invención es capaz de infectar las células del huésped, es incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en las células infectadas. En el contexto de la presente invención la expresión “virus incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en dichas células” hace referencia a los virus cuyo genoma está al menos parcialmente transcrito y traducido a proteínas víricas o incluso replicado, sin embargo, no está empacado en partículas víricas infecciosas. Por lo tanto, el MVA utilizado de acuerdo con la presente invención es un virus que produce infecciones abortivas en el huésped. Las infecciones abortivas se pueden producir por dos razones: de acuerdo con la primera opción una célula puede ser vulnerable a la infección pero no permitir la multiplicación del virus, por ejemplo, debido a que no todos los genes víricos necesarios para la multiplicación del virus en dicha célula se expresan y/o están presentes en el genoma del virus. El virus utilizado de acuerdo con la presente invención en las células humanas es el Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), que se explica en más detalle más adelante. Una infección abortiva puede también ser el resultado de la infección de células con virus defectuosos, que carecen del complemento total de genes víricos. Un ejemplo de dichos virus para las células humanas es DISC-HSV1 (virus del herpes simple restringido a ciclo único), es decir un virus del herpes simple, que está restringido a un único ciclo de infección (Dilloo *et al.*, Blood 1997, 89: 119-127). Este virus carece del gen para la glucoproteína esencial H (gH), pero puede reproducirse hasta un título alto en una línea celular complementaria que exprese gH. En las líneas celulares no complementarias que son permisivas para la proliferación del virus herpético, está restringido a un ciclo único de replicación, dando lugar a la liberación de virus no infecciosos. La expresión “incapaz de replicarse” se refiere preferentemente a los virus que no se replican en absoluto en las células del animal vacunado. Sin embargo, incluso esos virus MVA que tienen una actividad de replicación residual menor que es controlada por el sistema inmunitario inmaduro del recién nacido están dentro del alcance de la presente solicitud.

El MVA de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier MVA que sea capaz de infectar las células del animal pero que sea incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en dichas células. Se comprenderá, que un virus que es capaz de infectar las células de una primera especie animal pero que es incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en dichas células puede comportarse de un modo diferente en una segunda especie animal. Por ejemplo, los MVA-BN de seres humanos y sus derivados (ver a más adelante) son virus capaces de infectar las células del ser humano pero son incapaces de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en las células humanas. Los mismos virus se pueden replicar en los pollos, es decir, en los pollos, MVA-BN puede no ser un virus incapaz de replicarse en una descendencia vírica infecciosa en las células del pollo. Los expertos en la materia saben cuáles virus se deben elegir para una especie animal específica. Una prueba que permite determinar si un virus es capaz o no de replicarse en un animal neonato o prenatal se divulga en WO 02/42480 y usa la cepa de ratones AGR129. Los resultados obtenidos en este modelo de ratones son indicativos para los seres humanos. Por lo tanto, el término “incapaz de replicarse en una descendencia vírica infecciosa” según se usa en esta solicitud se corresponde con la expresión “ineptitud para replicarse *in vivo*” según se usa para ratones en WO 02/42480. A continuación se proporcionan más detalles de esta prueba. Los virus de acuerdo con la presente invención son preferentemente capaces de replicarse en al menos un tipo de células de al menos una especie animal. Por lo tanto, es posible amplificar el virus antes de la administración al animal que se va a vacunar y/o tratar. A modo de ejemplo se hace referencia a MVA-BN que se puede amplificar en las células CEF (fibroblasto de embrión de pollo) pero que es un virus incapaz de replicarse en una descendencia vírica infecciosa en el neonato humano. En este contexto se debe advertir que los virus inactivados química o físicamente no tienen todas las propiedades de esta realización preferida ya que los virus inactivados son capaces de infectar las células del animal neonato, incluido un ser humano, y son incapaces de replicarse para generar una descendencia infecciosa en el animal neonato, incluido un ser humano, pero estos virus son incapaces de replicarse en al menos un tipo de células de al menos una especie animal.

ES 2 288 609 T3

Para las células de mamíferos, en particular las células humanas, el virus de ADN es el Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).

5 El Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) está relacionado con el virus Vaccinia, un integrante del género Orthopoxvirus de la familia Poxviridae. MVA se generó mediante 516 pasajes seriados en fibroblastos de embriones de pollo de la cepa Ankara del Virus Vaccinia (CVA) (por una reseña consulte Mayr, A., *et al.* Infection 3, 6-14 [1975]). Como consecuencia de estos pasajes de largo plazo el virus MVA resultante suprimió aproximadamente 31 kilobases de su secuencia genómica y, por consiguiente, fue descrito como altamente restringido a las células de aves como células huésped (Meyer, H. *et al.*, J. Gen. Virol. 72. 1.031-1.038 [1991]). Se demostró, en una diversidad de modelos de animales que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. y Danner, K. [1978] Dev. Biol. Stand, 41: 225-34). Además, esta cepa de MVA se probó en ensayos clínicos como vacuna para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana (Mayr *et al.*, Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B 167, 375-390 [1987], Stickl *et al.*, Dtsch. med. Wschr, 99, 2.386-2.392 [1974]). En estos estudios participaron más de 120.000 seres humanos, incluidos pacientes de alto riesgo, y se demostró que, en comparación con las vacunas basadas en Vaccinia, MVA había disminuido la virulencia o la infecciosidad manteniendo al mismo tiempo una buena inmunogenicidad.

Las cepas preferidas de acuerdo con la presente invención son MVA 575, depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) con el número de depósito V00120707 y MVA-BN, depositado en la misma institución con el número de depósito V000083008 y sus derivados. Si está destinado a vacunar/tratar humanos MVA-BN y sus derivados se prefieren particularmente.

Las propiedades de las cepas de MVA particularmente preferidas, preferentemente las cepas que más se prefieren para los seres humanos, como MVA-BN y sus derivados, se pueden resumir del siguiente modo:

25 (i) capacidad de efectuar una replicación reproductiva en los fibroblastos de embriones de pollo (CEF) y en la línea celular BHK, pero incapacidad de efectuar una replicación reproductiva en la línea celular humana HaCat,

(ii) ineptitud para replicarse *in vivo*,

30 (iii) inducción de una inmunogenicidad mayor en comparación con la cepa conocida MVA 575 (ECACC V00120707) en un modelo de provocación letal y/o

(iv) inducción de al menos prácticamente el mismo nivel de inmunidad en regímenes de sensibilización con virus vaccinia/refuerzo con virus vaccinia en comparación con regímenes de sensibilización con ADN/refuerzo con virus vaccinia.

35 Las cepas de MVA preferidas para usar de acuerdo con la presente invención tienen la propiedad (ii) ineptitud para replicarse en el organismo que se va a vacunar o tratar y/o en el sistema de prueba correspondiente como se explica más adelante y preferentemente otra de las propiedades anteriores, más preferentemente otras dos de las propiedades anteriores. Las más preferidas son las cepas de MVA que tienen todas las propiedades anteriores. Un ejemplo de una cepa de MVA que tiene todas las propiedades anteriores en los seres humanos es MVA-BN. Los derivados preferidos de MVA-BN son derivados que tienen además de la característica (ii) al menos una de las propiedades anteriores, más preferentemente al menos dos de las propiedades anteriores. Los derivados que más se prefieren son los derivados de MVA-BN que tienen todas las propiedades anteriores.

45 Para obtener información detallada con respecto a los ensayos usados para determinar si una cepa de MVA tiene una o más de las características anteriores (i) a (iv) consultar WO 02/42480. Esta publicación también divulga cómo se pueden obtener los virus que tienen las propiedades deseadas. En particular, WO 02/42480 proporciona una definición detallada de las características de MVA-BN y de un derivado de MVA-BN y divulga en detalle los ensayos biológicos que se usan para determinar si una cepa de MVA es MVA-BN o un derivado. En otras palabras, las características de MVA-BN, la descripción de los ensayos biológicos que permiten evaluar si una cepa de MVA es MVA-BN o un derivado y los métodos que permiten obtener a MVA-BN o un derivado se divulgan en WO 02/42480. A continuación se resume brevemente cómo un experto en la materia llega a cepas de MVA que tienen una o más de las características anteriores y cómo se puede probar si una cepa de MVA dada tiene una o más de dichas características y es por lo tanto un virus muy preferido de acuerdo con la presente invención. No se debe entender que el resumen siguiente limita a la información siguiente la pertinencia de WO 02/42480 para la presente solicitud. En cambio, WO 02/42480 se incorpora aquí en su totalidad por referencia.

El término “incapaz de efectuar una replicación reproductiva” en la línea celular HaCat (Boukamp *et al.* 1988, J Cell Biol 106 (3): 761-71) se usa en la presente solicitud según se define en WO 02/42480. Por lo tanto, un virus “incapaz de efectuar una replicación reproductiva” en la línea celular HaCat es un virus que tiene una tasa de amplificación menor de 1 en la línea celular humana HaCat. Preferentemente, la tasa de amplificación del virus utilizado como vector de acuerdo con la invención es 0,8 o menor en la línea celular humana HaCat. La “tasa de amplificación” de un virus es el cociente entre el virus producido a partir de una célula infectada (Producción) y la cantidad usada originalmente para infectar las células en primer lugar (Insumo) (“tasa de amplificación”). Un cociente de “1” entre la producción y el insumo define un estado de amplificación en el que la cantidad de virus producido a partir de las células infectadas es la misma que la cantidad inicialmente usada para infectar las células. El término “derivados” de los virus como el depositado como ECACC V00083008 hace referencia preferentemente a los virus que tienen esencialmente las mismas características de replicación que la cepa depositada pero tienen diferencias en una o más partes de su genoma.

ES 2 288 609 T3

Los virus que tienen las mismas “características de replicación” que el virus depositado son los virus que se replican con tasas de amplificación similares a la de la cepa depositada en las células CEF y las líneas celulares BHK, HeLa, HaCat y 143B y que tienen una replicación similar *in vivo* según se determina en el modelo de ratones transgénicos AGR129 (ver más adelante).

El término “ineptitud para replicarse *in vivo*” se usa en la presente solicitud según se define en WO 02/42480. Por lo tanto, dicha expresión hace referencia a los virus que no se replican en los seres humanos ni en el modelo de ratones según se explica en WO 02/42480. Los ratones usados en WO 02/42480 son incapaces de producir linfocitos B y T maduros (ratones AGR129). En particular MVA-BN y sus derivados no matan a los ratones AGR129 en un período de al menos 45 días, más preferentemente de al menos 60 días, muy preferentemente de 90 días después de la infección de los ratones con 10^7 ufp de virus administradas intraperitonealmente. Preferentemente, los virus que presentan “ineptitud para replicarse *in vivo*” se caracterizan además porque no se recupera ningún virus de los órganos o tejidos de los ratones AGR129 45 días, preferentemente 60 días y muy preferentemente 90 días después de la infección de los ratones con 10^7 ufp de virus administradas intraperitonealmente.

En vez de los ratones AGR129 se puede usar otra raza de ratones que sea incapaz de producir linfocitos B y T maduros y como tal estén severamente inmunodeprimidos y sumamente vulnerables a un virus que se replica.

Los detalles del experimento de provocación letal utilizado para determinar si una cepa de MVA tiene “una inmunogenicidad mayor en comparación con la cepa 575 de MVA conocida” se explican en WO 02/42480. En dicho modelo de provocación letal los ratones sin vacunar mueren después de la infección con cepas de vaccinia competentes para la replicación como la cepa Western Reserve L929 TK+ o IHD-J. La infección con virus vaccinia competentes para la replicación se denomina “provocación” en el contexto de la descripción del modelo de provocación letal. En general se mata a los ratones cuatro días después de la provocación y se determina el título vírico en los ovarios mediante ensayos en placa estándar utilizando células VERO. El título vírico se determina para los ratones sin vacunar y los ratones vacunados con MVA-BN y sus derivados. Más específicamente MVA-BN y sus derivados se caracterizan porque en esta prueba después de la vacunación con 10^2 DICT₅₀ de virus/ml los títulos víricos en los ovarios se reducen en al menos un 70%, preferentemente en al menos 80%, más preferentemente en al menos 90% en comparación con los ratones sin vacunar.

En una realización preferida utilizada, MVA, en particular MVA-BN y sus derivados, son útiles para la administración de sensibilización/refuerzo. Los virus, en particular las cepas de MVA que son las que se usan preferentemente en la presente invención, como MVA-BN y sus derivados así como los virus recombinantes correspondientes que albergan secuencias heterólogas, se pueden usar para sensibilizar primero y luego reforzar las respuestas inmunitarias eficazmente en los animales nativos así como en los animales con una inmunidad preexistente a los poxvirus. Por lo tanto el virus que más se prefiere de acuerdo con la presente invención induce al menos prácticamente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de sensibilización con virus vaccinia/refuerzo con virus vaccinia en comparación con los regímenes de sensibilización con ADN/refuerzo con virus vaccinia.

Se considera que un virus vaccinia, en particular una cepa de MVA induce al menos prácticamente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de sensibilización con virus vaccinia/refuerzo con virus vaccinia cuando se comparan con los regímenes de sensibilización con ADN/refuerzo con virus vaccinia si la respuesta CTL medida según el “ensayo 1” o el “ensayo 2” según se divulgan en WO 02/42480, preferentemente en ambos ensayos, es al menos prácticamente la misma en los regímenes de sensibilización con virus vaccinia/refuerzo con virus vaccinia cuando se comparan con los regímenes de sensibilización con ADN/refuerzo con virus vaccinia. Más preferentemente la respuesta CTL después de la administración de sensibilización con virus vaccinia/refuerzo con virus vaccinia es mayor en al menos uno de los ensayos, cuando se compara con los regímenes de sensibilización con ADN/refuerzo con virus vaccinia. Muy preferentemente la respuesta CTL es mayor en ambos ensayos.

El virus usado de acuerdo con la presente invención puede ser un MVA no recombinante, es decir un virus que no contenga secuencias nucleotídicas heterólogas. Un ejemplo de un virus vaccinia no recombinante es MVA-BN y sus derivados. Alternativamente el virus puede ser un MVA recombinante que contenga secuencias nucleotídicas adicionales, que sean heterólogas para el virus.

El término “heterólogas” según se usa en la presente solicitud hace referencia a cualquier combinación de las secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentra normalmente íntimamente asociada al virus en la naturaleza, tal virus también se denomina “virus recombinante”.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga se selecciona preferentemente entre una secuencia que codifica al menos un antígeno; un epítipo antigénico, proteínas beneficiosas y/o un compuesto terapéutico.

La expresión “proteínas beneficiosas” según se usa en la presente solicitud hace referencia a cualquier proteína que sea útil para proteger a un animal contra un antígeno seleccionado entre un antígeno tumoral y un antígeno extraño, donde el antígeno tumoral y el antígeno extraño son diferentes de los antígenos asociados al virus. Alternativamente y más en particular las “proteínas beneficiosas” son activas para aumentar el nivel de los factores que activan las células dendríticas y/o son activas para aumentar el número de células dendríticas y/o son activas para aumentar la producción y/o el contenido celular de un interferón (IFN) o IL-12. Por lo tanto, los ejemplos de tales proteínas beneficiosas son los interferones como IFN-alfa o IFN-beta, IL-12, Flt3-L y/o GM-CSF.

ES 2 288 609 T3

Los epítomos antigénicos pueden ser cualquier epítomo para el que tenga sentido inducir una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de epítomos antigénicos son los epítomos del *Plasmodium falciparum*, *Mycobacteria*, del virus de la gripe, de los virus seleccionados de la familia de los Flavivirus, los Paramyxovirus, los virus de la hepatitis, los virus de la inmunodeficiencia humana o de los virus que causan la fiebre hemorrágica como los Hantavirus o Filovirus, es decir, el virus del Ébola o el virus de Marburgo. Por lo tanto, si por ejemplo, un MVA recombinante que expresa los epítomos heterólogos se usa para vacunar neonatos de acuerdo con la presente invención, el resultado de este tratamiento no es sólo una vacunación general debida a la maduración acelerada del sistema inmunitario sino también una vacunación específica contra el epítomo heterólogo expresado del MVA heterólogo.

Un “compuesto terapéutico” codificado por el ácido nucleico heterólogo en el virus recombinante puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico terapéutico como un ácido nucleico antisentido o un péptido o proteína con la actividad biológica deseada.

La inserción de la secuencia de ácido nucleico heteróloga se hace preferentemente en una región no esencial del genoma del virus. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga se inserta en un sitio del genoma del virus donde se produce naturalmente delección (para el MVA divulgado en PCT/EP96/02926). Los métodos acerca de cómo insertar las secuencias heterólogas en el genoma del virus como un genoma poxvírico son conocidos por los expertos en la materia.

La presente invención también describe una preparación farmacéutica y una vacuna que comprende MVA, por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo animal vivo, incluido un ser humano.

La preparación farmacéutica en general puede incluir uno o más excipientes, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Dichas sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, humectantes o emulsionantes, amortiguadores del pH, o similares. Los excipientes adecuados son habitualmente moléculas grandes, de metabolización lenta como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos, agregados lipídicos, o similares.

Para la elaboración de las vacunas, el virus o sus recombinantes se convierten en una forma fisiológicamente aceptable. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia. La vacuna de MVA se puede preparar basándose en la experiencia en la elaboración de vacunas de poxvirus utilizadas para vacunar contra la viruela según describen Stickl, H. *et al.* [1974] Dtsch. med. Wschr, 99, 2.386-2.392). Por ejemplo, el virus purificado se almacena a -80°C con un título de 5×10^8 DICT₅₀/ml formulado en aproximadamente Tris 10 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4. Para la elaboración de las dosis de vacuna, se liofilizan, por ejemplo, $10^1 \cdot 10^8$ partículas del virus como MVA en 100 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) en presencia de peptona al 2% y albúmina humana al 1% en una ampolla, preferentemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, las dosis de vacuna se pueden producir mediante liofilización en etapas del virus en una formulación. Esta formulación puede contener otros aditivos como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros aditivos como antioxidantes o gas inerte, estabilizantes o proteínas recombinantes (por ejemplo, albúmina sérica humana) adecuados para la administración *in vivo*. Después se sella la ampolla de vidrio y se puede almacenar entre 4°C y temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, mientras no sea necesaria la ampolla se almacena preferentemente a temperaturas por debajo de -20°C .

Para la vacunación o el tratamiento, el liofilizado se puede disolver en 0,1 a 0,5 ml de una solución acuosa, preferentemente solución salina o solución amortiguadora Tris y administrarse ya sea sistémicamente o localmente, es decir por vía parenteral, intramuscular u otra vía de administración conocida por los profesionales del área. Los técnicos con experiencia en el tema pueden optimizar la modalidad de administración, la dosis y el número de administraciones de una manera conocida.

El MVA utilizado de acuerdo con la presente invención, se puede administrar mediante aplicación oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica y/o subcutánea. En los animales pequeños la inoculación para la inmunización se realiza preferentemente parenteral o nasalmente, mientras que en los animales más grandes o los seres humanos se prefiere la inoculación subcutánea, intramuscular u oral.

MVA se administra preferentemente en una dosis de 10^1 DICT₅₀ (dosis infecciosa de cultivo tisular) a 10^9 DICT₅₀.

Según se señala precedentemente MVA, como MVA-BN y sus derivados, se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz en una primera inoculación (“inoculación de sensibilización”) y en una segunda inoculación (“inoculación de refuerzo”).

En el contexto de la presente invención el término “animal” abarca también a los seres humanos. De manera más general, el animal es un animal vertebrado, preferentemente un mamífero incluido un ser humano. Ejemplos específicos de los animales son las mascotas como los perros, los gatos, los animales económicamente importantes como los terneros, el ganado bovino, los ovinos, los caprinos, los caballos, los cerdos y otros animales como los ratones y las ratas. Para estas especies animales y para los seres humanos MVA es el virus preferido. La invención también se puede usar para las aves económicamente importantes como pavos, patos, gansos y gallinas si se usan virus que son capaces de infectar las células de las aves pero incapaces de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en dichas células.

La expresión “animales domésticos” según se usa en esta descripción hace referencia preferentemente a animales domésticos mamíferos, más preferentemente a los perros, los gatos, los terneros, el ganado bovino, los ovinos, los caprinos, los cerdos, los caballos y los ciervos.

5 A modo de ejemplo, MVA, en particular MVA-BN y sus derivados se pueden usar como vacunas específicas, es decir, para provocar una respuesta inmunitaria que proteja al recién nacido vacunado contra las enfermedades causadas por un virus virulento que pertenezca al mismo grupo, familia o género de virus que el virus que se usó para la vacunación. A modo de ejemplo MVA según se define precedentemente, en particular MVA-BN y sus derivados se pueden usar para vacunar a los seres humanos recién nacidos contra las infecciones por poxvirus, en particular contra la viruela. MVA, en particular MVA-BN y sus derivados, también se pueden usar para vacunar animales vertebrados 10 contra las infecciones por poxvirus de importancia veterinaria. El virus usado para la vacunación puede ser un virus no recombinante, como MVA-BN o sus derivados, o un virus recombinante que albergue genes en el genoma del virus que no se encuentran naturalmente en dicho genoma. El virus recombinante alberga otros genes que son útiles para estimular la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de esta clase de genes son los genes de citocina y los genes de interferón.

15 Además, a modo de ejemplo, se puede vacunar a los neonatos con un virus recombinante que albergue una secuencia de ácido nucleico heteróloga según se define precedentemente para inducir una respuesta inmunitaria contra la secuencia aminoacídica expresada a partir de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. A modo de ejemplo la secuencia de ácido nucleico puede codificar un antígeno o un epítipo antigénico según se define precedentemente. Los 20 ejemplos de un virus recombinante son MVA recombinante, en particular MVA-BN recombinante o un derivado, que comprendan un ácido nucleico heterólogo que codifique los antígenos de (i) otros virus que no sean MVA, como VIH-1, VIH-2, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del sarampión, (ii) antígenos tumorales, (iii) bacterias, (iv) hongos. Si el antígeno expresado del virus recombinante es por ejemplo, un antígeno del VIH es posible usar el virus recombinante para inducir una respuesta inmunitaria en el neonato vacunado 25 contra el VIH y prevenir el SIDA. En un sentido más amplio el virus recombinante que expresa el antígeno o epítipo antigénico se usa para inducir una respuesta inmunitaria contra el agente del cual deriva la secuencia heteróloga y/o contra el agente que comprende el antígeno o el epítipo antigénico.

De acuerdo con la invención se ha encontrado en tercer lugar, inesperadamente, que los virus que son capaces de 30 infectar las células del animal neonato, incluido un ser humano, pero que son incapaces de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en el animal neonato, incluido un ser humano, se pueden usar para la preparación de un medicamento para proteger un animal recién nacido, incluido un ser humano, contra un antígeno seleccionado entre el antígeno tumoral y el antígeno extraño, donde el antígeno tumoral y/o el antígeno extraño son diferentes de los antígenos asociados al virus.

35 De acuerdo con la invención los recién nacidos vacunados con MVA, como MVA-BN y sus derivados, están protegidos contra una provocación con antígenos extraños como los agentes infecciosos. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, MVA es una vacuna general para los recién nacidos, es decir mediante la vacunación de los recién nacidos con MVA el sistema inmunitario de los recién nacidos se torna más competente para lidiar con los 40 antígenos extraños como los virus. En la sección de los ejemplos esto se ejemplifica para la vacunación con MVA y una provocación posterior con virus del herpes simple tipo 1. Por lo tanto, si se usa MVA para la vacunación de los recién nacidos, los animales vacunados están más protegidos contra los antígenos extraños que los animales sin vacunar en el lapso crítico hasta que se establece un sistema inmunitario funcional y maduro.

45 De acuerdo con la presente invención “el antígeno tumoral y/o el antígeno extraño son diferentes de los antígenos asociados al virus”. Esta expresión se interpretará en el sentido de que de acuerdo con la invención la intención principal no es usar MVA para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus mismo. En cambio el virus se usa para inducir una respuesta inmunitaria o al menos una estimulación inmunitaria general que proteja al huésped contra los antígenos extraños y los antígenos tumorales, respectivamente, que no están asociados al virus. La expresión “antígenos 50 asociados al virus” hace referencia a los epítipos y los antígenos de la partícula vírica y a los antígenos y los epítipos en la superficie de una célula infectada con el virus que son el resultado de la expresión del genoma del virus.

En el contexto de esta realización la expresión “antígenos extraños” hace referencia a cualquier antígeno y epítipo que no sea naturalmente una parte o un componente del organismo del animal. Antígenos extraños son especialmente 55 los antígenos y epítipos de los agentes infecciosos y las toxinas. Los agentes infecciosos típicos son virus como los herpesvirus, los retrovirus, los virus de la rabia, los rhabdovirus, los adenovirus; las bacterias como Salmonella, Mycoplasma, Meningococcus, Haemophilus; los priones o los hongos.

La invención no sólo es de interés para vacunar animales contra los antígenos extraños sino que, en una realización 60 alternativa, también es adecuada para vacunar contra antígenos tumorales. “Antígenos tumorales” son los antígenos asociados a ciertas enfermedades tumorales. Los antígenos tumorales son con mayor frecuencia los antígenos codificados por el genoma del huésped que presenta el tumor. Por lo tanto, en un sentido estricto los antígenos tumorales no son antígenos extraños. Sin embargo, los antígenos tumorales se encuentran en cantidades significativas en los tumores, mientras que la cantidad de antígenos tumorales en los tejidos normales es significativamente inferior y con mayor frecuencia no se encuentra ningún antígeno tumoral en el tejido normal. Los ejemplos de antígenos tumorales 65 son conocidos por los expertos en la materia e incluyen por ejemplo, los antígenos MAGE. MVA es eficaz contra estos antígenos tumorales puesto que la vacunación de los animales produce una activación y/o una maduración acelerada del sistema inmunitario que luego puede dar lugar a la destrucción de las células tumorales.

ES 2 288 609 T3

La expresión “que protege contra un antígeno” hace referencia al desarrollo de una respuesta inmunitaria, que se dirige contra el antígeno extraño o tumoral. Si el antígeno extraño es un agente infeccioso el huésped está protegido contra dicho agente, es decir el huésped desarrolla una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno. En consecuencia, la infección con el agente infeccioso deriva en una enfermedad menos grave o en ninguna enfermedad. La expresión “que protege” no se debe entender en el sentido de que hay siempre una protección del 100% contra el antígeno extraño o tumoral. En cambio, el término “protección” como se usa en esta solicitud se refiere a cualquier efecto beneficioso que ayude al animal a lidiar con el antígeno extraño y el antígeno tumoral, respectivamente.

De acuerdo con la presente invención dicho efecto protector se ejerce durante al menos 5 días, preferentemente durante al menos 7, 14 ó 28 días después de la primera vacunación. En otras palabras, el animal vacunado y o tratado está protegido por ejemplo, contra un antígeno extraño si el animal entra en contacto con dicho antígeno después de 5, 7, 14 y 28 días, respectivamente.

En el contexto de la presente invención el efecto de la vacunación de los recién nacidos con MVA se puede explicar mediante la inducción o la mejora de la maduración del sistema inmunitario y/o la activación del sistema inmunitario. En el contexto de la presente invención la expresión “inducción o mejora” de la maduración del sistema inmunitario” hace referencia entre otras cosas al aumento acelerado de células dendríticas o de sus precursoras en los vacunados en relación con los testigos. Las expresiones “aceleración de la maduración” del sistema inmunitario y “mejora de la maduración” del sistema inmunitario se usan indistintamente en esta descripción.

La “activación del sistema inmunitario” se caracteriza por la expresión en la superficie de las células de moléculas y hormonas que facilitan la interacción o el tráfico célula/célula y/o por la secreción de dichas moléculas y hormonas por las células. Los receptores específicos captan estas señales y responden. Los marcadores de la activación son entre otros Flt3-L, IL-12, IFN-alfa, MHC-II y CD8, en particular CD8alfa (ver más adelante).

El desarrollo o la maduración acelerados del sistema inmunitario se correlacionan con un aumento del nivel de los factores que activan y/o movilizan las células dendríticas (CD) o sus células precursoras y/o con un aumento del número de células dendríticas y de sus células precursoras y/o con un aumento de la producción y/o el contenido celular de un interferón o IL-12. Un ejemplo de células precursoras de CD que son inducidas por MVA, son las precursoras de CD plasmacitoides que son muy importantes para la defensa contra las infecciones víricas y que parecen producir IFN α/β .

Más específicamente, la mejora de la maduración del sistema inmunitario se define preferentemente mediante un aumento de al menos 2 veces en los marcadores superficiales encontrados en las CD, como MHC-II, CD40 y/o CD80/86. Preferentemente dicho aumento se puede medir en la sangre. Otros marcadores para caracterizar una mejora de la maduración del sistema inmunitario son Flt3-L, IL-12, IFN-alfa, MHC-II y CD8a (ver más adelante). Además, la maduración acelerada del sistema inmunitario se correlaciona preferentemente con al menos un aumento de 1,5 veces, preferentemente con al menos un aumento de 2,0 veces en el número de células CD11c positivas en la sangre y/o el bazo 7 días después de la administración de MVA-BN a los animales recién nacidos en comparación con los animales testigo que no recibieron MVA-BN. Por otra parte, la mejora de la maduración del sistema inmunitario se puede correlacionar preferentemente con un aumento de al menos 1,5 veces, más preferentemente un aumento de al menos 2,0 veces en la concentración de Flt3-L dos días después de la vacunación de los neonatos con los virus de acuerdo con la presente invención, cuando se comparan con testigos coincidentes en edad.

En este contexto se debe advertir que hay una asociación entre el fenotipo y la función de las poblaciones de CD murinas y humanas que se pueden caracterizar por su fenotipo superficial (Hochrein *et al.* 2002. Hum. Immunol. 63:1.103). Las CD se pueden detectar en la sangre mediante citometría de flujo usando una variedad de marcadores superficiales (MacDonald *et al.* 2002. Blood. 100:4.512) eso también permite identificar poblaciones específicas de CD, como las CD plasmacitoides (Dzionek *et al.* 2002. Hum Immunol. 63: 1.133; Dzionek *et al.* 2000. J. Immunol. 165: 6.037). Usando técnicas similares también se pueden detectar las CD en otros tejidos humanos (Summers *et al.* 2001. Am. J. Pathol. 159: 285).

De acuerdo con la presente invención los virus como los definidos antes también se podrían usar para tratar animales neonatos para aumentar el nivel de los factores que activan y o movilizan las células dendríticas (CD) o sus células precursoras y/o para aumentar el número de células dendríticas y de sus células precursoras y/o para aumentar la producción y/o el contenido celular de un interferón o IL-12. Se demostró que después de la vacunación con MVA-BN las células dendríticas plasmacitoides fabrican significativamente más IL-12 y tienen una mayor producción de IFN-alfa y expresión de MHC-II y CD8a. El aumento de IL-12 después de la administración de los virus usados de acuerdo con la presente invención es preferentemente de 2 veces, más preferentemente de 100 veces, 500 veces, 1.000 veces, 2.500 veces o 5.000 veces. El aumento de la concentración de Flt3-L dos días después de la vacunación de los neonatos con MVA, muy preferentemente con MVA-BN o sus derivados, es preferentemente de 1,5 veces, más preferentemente de 2,0 veces en comparación con los testigos coincidentes en edad.

El término “activación de las células dendríticas o de sus precursoras” hace referencia a la maduración de las CD a células que presentan antígeno a través de los estadios celulares definidos por la enfermedad dirigidas por hormonas y estímulos. Los intermediarios de las CD se denominan precursoras. Las CD inmaduras alcanzan la periferia. Diferentes estímulos (antigénicos) activan las CD. Los marcadores de la activación, que se expresan en las células dendríticas activadas son entre otros Flt3-L, IL-12, IFN-alfa, MHC-II y CD8a (ver más adelante).

ES 2 288 609 T3

Se observó que las hormonas tales como GM-CSF dan lugar a más CD inmaduras en la periferia. Debido a que el GM-SCF da lugar a más precursoras de las CD en la médula ósea, la sangre y los órganos periféricos (y las células se tienen que trasladar allí), este fenómeno se ha denominado “movilización de las células dendríticas o de sus precursoras”. Esta definición también se usa en esta descripción.

En consecuencia, la vacunación de animales incluido un ser humano es especialmente útil, si está destinada a aumentar el nivel de los factores que activan las células dendríticas (CD) o sus células precursoras y/o a aumentar el número de células dendríticas o de sus células precursoras y/o a aumentar la producción y/o el contenido celular de un interferón o de IL-12.

Los factores que activan las células dendríticas comprenden entre otros a Flt3-L (Lyman *et al.*, Cell 1993, 75:1.157-1.167) y GM-CSF. Los interferones típicos de acuerdo con la presente invención son IFN-alfa e IFN-beta. Los virus usados de acuerdo con la presente invención inducen a Flt3-L y se supone que algunos de los efectos beneficiosos observados son debidos a dicha inducción.

En el contexto de la presente solicitud un animal o ser humano recién nacido se define como un animal o ser humano que todavía no tiene un sistema inmunitario maduro. En toda esta especificación las expresiones “animal recién nacido” y “animal neonato” se usan sinónimamente. Un sistema inmunitario maduro se caracteriza por la capacidad de activar plenamente el sistema inmunitario innato y por el hecho de que todas las funciones y productos conocidos de los linfocitos T y B están en su sitio, en particular los isotipos de la inmunoglobulina como la IgA y la IgE. Por lo tanto un sistema inmunitario inmaduro se caracteriza por un número bajo de linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas en relación con el de los adultos, por una producción de IFN, que es baja en comparación con la de los adultos y por el hecho de que los órganos linfoides secundarios no están totalmente maduros. Más específicamente un “neonato” o “recién nacido” en el contexto de la presente invención se puede definir como un animal de poca edad que tiene un número de células CD4+ esplénicas que son preferentemente al menos 2 veces, más preferentemente al menos 20 veces, más preferentemente al menos 200 veces, más preferentemente al menos 2.000 veces, muy preferentemente al menos 20.000 veces menor que el número promedio de células CD4+ esplénicas en los adultos.

En los ratones el sistema inmunitario está maduro a la edad de 4 semanas. En los humanos probablemente entre los 6 meses y 1 año de edad. En los gatos y perros el sistema inmunitario está maduro generalmente a la edad de 6 meses, en los terneros, los ovinos y los cerdos a las 4 a 12 semanas de edad. La vacunación con MVA se lleva a cabo preferentemente antes de que el sistema inmunitario esté maduro. Sin embargo, dado que la madurez se desarrolla casi exponencialmente después del nacimiento lo que más se prefiere es vacunar con MVA tan pronto como sea posible después del nacimiento. Puesto que en todos los animales domésticos importantes y en los seres humanos el sistema inmunitario no está maduro hasta 4 semanas después del nacimiento, en general es preferible que la vacunación con MVA, se haga preferentemente en las 4 semanas siguientes al nacimiento, más preferentemente en las 2 semanas siguientes al nacimiento, aún más preferentemente en la semana siguiente al nacimiento, muy preferentemente en los 3 días siguientes al nacimiento. Estos términos generales son aplicables a todos los animales domésticos importantes, en particular a todos los animales domésticos mamíferos importantes, incluidos los seres humanos. El experto en la materia será consciente del hecho de que incluso los animales de más edad se pueden considerar como recién nacidos/neonatos en el contexto de la presente invención y que, por lo tanto, la vacunación también se puede llevar a cabo con éxito en animales de más edad, cuando el sistema inmunitario todavía no está maduro 4 semanas después del nacimiento. Por lo tanto, en los seres humanos la vacunación se puede llevar a cabo en los 6 meses siguientes al nacimiento, más preferentemente en los 3 meses siguientes al nacimiento, más preferentemente en los 2 meses siguientes al nacimiento, más preferentemente en las 4 semanas siguientes al nacimiento, más preferentemente en las 2 semanas siguientes al nacimiento, aún más preferentemente en la semana siguiente al nacimiento, muy preferentemente en los 3 días siguientes al nacimiento.

A modo de ejemplo, puesto que los mejores efectos de MVA como una vacuna general se observan si el virus se administra a un sistema inmunitario inmaduro, se pueden vacunar los animales incluidos los seres humanos antes de nacer. La vacunación prenatal puede ser aconsejable en los animales económicamente importantes como el ganado bovino o los cerdos. Si la placenta deja pasar al virus el prenatal se puede vacunar sencillamente vacunando al animal madre. Por lo tanto, la vacunación del animal madre para vacunar al prenatal es particularmente promisoría en un animal que tenga una placenta endoteliocorial, como los perros, los gatos, las ratas y los ratones o que tenga una placenta hemocorial, como los primates incluidos los seres humanos. En los animales que tienen una placenta epiteliocorial, como el ganado bovino y ovino o que tienen una placenta sindesmocorial, como los cerdos y los caballos, la vacunación de los prenatos se puede hacer por administración intrauterina. Desde luego, esta modalidad de administración también se puede usar en los animales que tienen placenta endoteliocorial o hemocorial.

Dado que MVA produce una maduración acelerada del sistema inmunitario y que MVA es por lo tanto útil como una vacuna general, los animales vacunados están protegidos contra una diversidad de enfermedades. Más específicamente MVA se puede usar para vacunar a los gatos para el bienestar general y contra el herpes felino o la peritonitis infecciosa felina. MVA se puede usar en los perros para el bienestar general y contra las enfermedades (víricas) asociadas a las vías respiratorias. MVA se puede usar en los cerdos para el bienestar general y contra infecciones por Haemophilus o Mycoplasma, especialmente en cerdos para engorde.

Como se señaló a modo de ejemplo, MVA se puede usar en los animales recién nacidos o prenatos para protegerlos contra un antígeno extraño y/o un antígeno tumoral, donde el antígeno tumoral es diferente de los antígenos asociados

al virus usado para la vacunación. Sin embargo, esto no está restringido a los animales recién nacidos y prenatos. En cambio, esto se puede llevar a cabo en animales de todas las edades, ya que se puede observar un efecto beneficioso también en los animales adultos. Por lo tanto, MVA en particular MVA-BN y sus derivados son útiles para proteger a un animal, incluido un ser humano, contra un antígeno seleccionado entre un antígeno tumoral y un antígeno extraño, donde el antígeno tumoral y/o el antígeno extraño son diferentes de los antígenos asociados al virus. Según se señala antes, MVA es capaz de infectar células del animal pero es incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en dichas células. Toda la información, las definiciones, incluida la definición de la duración del efecto protector y los ejemplos dados para los neonatos también se aplican a los adultos.

En contraposición a los recién nacidos, el sistema inmunitario de los animales adultos ya maduró. No obstante, podría ser que el sistema inmunitario estuviera debilitado debido a ciertas enfermedades o sencillamente debido a la edad del animal. Especialmente en personas inmunodeprimidas y en las personas ancianas la administración de MVA al animal puede tener un efecto beneficioso entre otras cosas por el aumento del nivel de los factores que activan y/o movilizan las células dendríticas (CD) o sus células precursoras y/o por el aumento del número de células dendríticas o de sus células precursoras y/o por el aumento de la producción y/o el contenido celular de un interferón o de IL-12. Por lo tanto, incluso en los animales adultos la administración de MVA puede dar lugar a una mayor competencia del sistema inmunitario para lidiar con los antígenos extraños y/o los antígenos tumorales. En otras palabras, aunque no es parte de la invención reivindicada, MVA es útil para la activación del sistema inmunitario en general.

La invención se refiere además a MVA para la elaboración de un medicamento que se va a administrar a un animal neonato, incluido un ser humano, donde dicho medicamento aumenta el nivel de los factores que activan las células dendríticas y/o aumenta el número de células dendríticas y/o aumenta la producción y/o el contenido celular de un interferón (IFN) o de IL-12. Todas las definiciones proporcionadas antes para las otras realizaciones también se aplican a la presente realización. Según esta realización la invención no apunta principalmente a inducir una protección contra los antígenos extraños y/o los antígenos tumorales. En cambio, esta realización tiene como finalidad tratar las afecciones y enfermedades caracterizadas por un bajo nivel de los factores que activan las células dendríticas y/o por un número insuficiente o demasiado bajo de células dendríticas y/o por una producción y/o contenido celular bajos de un interferón (IFN) o de IL-12. Por lo tanto, según esta realización el tratamiento con MVA podría proteger contra las alergias o las enfermedades autoinmunitarias. Nuevamente, este tratamiento es particularmente prometedor si MVA se administra a los animales recién nacidos.

A modo de ejemplo, MVA en particular MVA-BN y sus derivados, es particularmente útil para inducir respuestas inmunitarias en los animales inmunodeprimidos, por ejemplo, los monos ($CD4 < 400/\mu l$ de sangre) infectados con el VIS, o los seres humanos inmunodeprimidos. El término "inmunodeprimido" describe el estado del sistema inmunitario de un individuo, que muestra sólo respuestas inmunitarias incompletas o tiene una eficacia reducida en la defensa contra agentes infecciosos.

A modo de ejemplo, MVA se puede usar en un método para proteger a un animal, incluido un ser humano, contra un antígeno seleccionado entre un antígeno tumoral y un antígeno extraño, mediante la administración de un virus de acuerdo con la presente invención, en particular el Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), donde el antígeno tumoral y/o el antígeno extraño son diferentes de los antígenos asociados al virus.

Además, a modo de ejemplo, MVA se puede usar en un método para el tratamiento de un animal, incluido un ser humano, para aumentar el nivel de los factores que activan las células dendríticas y/o aumentar el número de células dendríticas y/o aumentar la producción y/o el contenido celular de un interferón (IFN) o de IL-12, que comprende la administración de un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).

Resumen de la invención

El uso del Virus Ankara Modificado (MVA) para la preparación de un medicamento destinado a la vacunación o el tratamiento de un animal neonato, incluido un ser humano, según el cual MVA es capaz de infectar las células del animal neonato, incluido un ser humano, pero incapaz de replicarse para generar una descendencia vírica infecciosa en el animal neonato, incluido un ser humano, en el que el tratamiento induce o mejora la maduración del sistema inmunitario.

El uso, como el precitado, según el cual la cepa de MVA es MVA-BN, depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) con el número de depósito V00083008 y sus derivados.

El uso, como el precitado, según el cual MVA se administra mediante aplicación oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica y/o subcutánea.

El uso, como el precitado, según el cual MVA se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz en una primera inoculación ("inoculación de sensibilización") y en una segunda inoculación ("inoculación de refuerzo").

El uso, como el precitado, según el cual MVA se administra al animal, incluido un ser humano, en una cantidad de al menos 10^1 DICT50 (dosis infecciosa de cultivo tisular).

ES 2 288 609 T3

El uso, como el precitado, según el cual el genoma de MVA comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

5 El uso, como el precitado, según el cual la secuencia de ácido nucleico heteróloga se selecciona entre una secuencia que codifica al menos un antígeno, un epítipo antigénico y/o un compuesto terapéutico.

El uso, como el precitado, según el cual la vacunación o el tratamiento se usan para inducir o mejorar la maduración y/o la activación del sistema inmunitario.

10 El uso, como el precitado, según el cual el tratamiento se usa (i) para aumentar el nivel de los factores que activan y/o movilizan las células dendríticas o sus células precursoras, (ii) para aumentar el número de células dendríticas o de sus células precursoras o (iii) para aumentar la producción y/o el contenido celular de un interferón (IFN) o de IL-12.

15 El uso, como el precitado, según el cual el factor que activa las células dendríticas es Flt3-L y/o GM-CSF.

El uso, como el precitado, según el cual el interferón es IFN α y/o IFN β .

Breve descripción de las figuras

20 Figura 1A: Se inyectaron, una vez, a ratones recién nacidos dentro de las 24-48 h del nacimiento, 10⁶ u.f.p de MVA o DISC HSV-1 o se los trató con solución salina fisiológica (NaCl) como testigos. A los 7 días de edad, se usó, CD11c, un marcador pan de CD para determinar estas células en la sangre periférica por citometría de flujo. Se muestran la desviación media y estándar de 3 a 5 experimentos.

25 Figura 1B: El mismo experimento que en la Fig.1A. Sin embargo, las células CD11c se determinaron en el bazo por citometría de flujo.

30 Figura 1C: El mismo experimento que en la Fig.1A. Sin embargo, las células CD11c se determinaron en el líquido peritoneal por citometría de flujo.

Figura 2: Se vacunó a los ratones con MVA-BN según se indica en la columna de la izquierda. Después de dos semanas se determinaron los porcentajes de células CD11c+ simple y CD11c+/CD8+ doble positivas en el bazo y en la sangre por citometría de flujo.

35 Figura 3: Se inyectó a los ratones recién nacidos MVA o NaCl a los testigos los días 1 y 5 de edad. El día 8, se determinó Flt3-L murino en el suero de estos ratones mediante ELISA y los valores se informan en pg/ml.

40 Figura 4: Se inyectaron, una vez, a ratones recién nacidos, dentro de las 24 a 48 h del nacimiento, 10⁶ u.f.p. de MVA o se los trató con NaCl como testigos. A los 7 días de edad, todos los ratones fueron expuestos a 100 x DL50 de la cepa F de HSV 1. El número de animales sobrevivientes se controló durante 21 días.

45 Figura 5: Se trató a los ratones como en la Fig. 4. Los datos representan 9 experimentos de provocación diferentes con 100 DL50 de HSV-1. Ninguno de los animales testigo sobrevivió a la provocación.

Figura 6: Supervivencia de ratones adultos vacunados con MVA-BN en el primer día de vida después de una provocación letal con vaccinia. Se vacunaron tres camadas de 6 crías de 1 día (18 ratones) con MVA-BN (2,5 x 10⁷ DICT50) y a las 4 semanas (ratones adultos) se los provocó con una dosis letal de vaccinia: la vacunación con MVA-BN indujo claramente una inmunidad protectora en los ratones neonatos que duró hasta la edad adulta.

Ejemplos

Ejemplo 1

55 (i) *MVA-BN y DISC-HSV inducen CD del fenotipo CD11c+ y CD8+ en los animales recién nacidos*

Primer conjunto de experimentos: Los ratones recién nacidos son naturalmente inmunodeficientes porque el sistema de IFN no está maduro. El número y el estado de activación de las CD, las mejores productoras de IFN que se conocen actualmente, no fue analizado. Las CD se pueden inducir *in vitro* así como *in vivo* mediante una diversidad de estímulos. En estos estudios se probó si una replicación controlada de MVA-BN podría inducir CD y se analizó su fenotipo. Se inyectaron a grupos de ratones 10⁶ unidades formadoras de placas (u.f.p.) de MVA-BN o solución salina sola dentro de 1 a 2 días después del nacimiento y en algunos casos 5 días después del nacimiento. Se analizaron la sangre y células esplénicas de ratones individuales de ambos grupos mediante FACS (separador de células activadas con fluorescencia) y se compararon los datos.

65 Los datos de 7 a 8 ratones individuales indicaron que el tratamiento con MVA-BN aumentó las células CD11c+ en 2 a 3 veces acompañado de un aumento de la expresión de MHC II y una mayor presencia de linfocitos T del tipo CD4 o CD8. De manera interesante, CD19/54, un marcador de los linfocitos B maduros disminuyó indicando

ES 2 288 609 T3

que estas células emigraron a órganos diferentes del bazo o que las precursoras de los linfocitos B fueron reclutadas precozmente para otros linajes en particular CD del fenotipo plasmacitoide que acarrea marcadores de linfocitos B tempranos (B220).

5 Los datos de tres experimentos diferentes indicaron reproducibilidad y diferencias significativas. Los experimentos con DISC-HSV-1, una vacuna vírica de replicación controlada diferente, induce cantidades semejantes de células CD11c+ después de la sensibilización neonatal.

Los resultados se resumen en la Fig. 1A-C.

10

Para investigar más a fondo las subpoblaciones de CD en la sangre y el bazo y analizar el efecto a largo plazo del tratamiento con MVA-BN, se analizaron las células de la sangre y el bazo a las 2 semanas de edad. En ese momento de toma de muestras, los animales tratados tuvieron aproximadamente dos veces el número de células CD11c+ en el bazo que tenían a la semana de vida pero un tratamiento único con el virus al nacer elevó a 3 veces el número de estas células en el bazo 2 semanas más tarde (Fig. 2). Se observaron efectos similares en la sangre excepto que CD11c+/CD8a+ fueron aproximadamente 4 veces mayores. Un tratamiento único con MVA-BN a los 7 días del nacimiento produjo un aumento de CD11c+/CD8a+ de 13 a 40 veces con un efecto menos notable sobre las células CD11c+. Como se esperaba, dos vacunaciones al nacer y a los 7 días tuvieron un efecto considerable sobre las células CD11c+. Los diversos efectos se muestran en la figura 2.

20

Segundo conjunto de experimentos: Ratones de una semana que habían sido vacunados al nacer con $2,5 \times 10^7$ DICT₅₀ de MVA-BN mostraron una composición diferente en las poblaciones de células inmunológicamente importantes en el bazo y la sangre que los ratones testigo (Tabla 1). En la sangre hubo un aumento en la población de linfocitos CD8 positivos así como un aumento en el número de linfocitos NK. El número de células CD11c positivas fue aproximadamente 3 veces superior que en los testigos y el porcentaje de linfocitos B (B220 y células CD19 doble positivas) disminuyó significativamente. En el bazo el número total de células no difirió entre los animales inmunizados y los testigos. En contraposición a la sangre, el bazo de los animales vacunados tuvo más linfocitos T CD4 positivos que los testigos y el número de linfocitos NK no aumentó. De manera similar que en la sangre el número relativo de linfocitos CD8 positivos aumentó y el número de linfocitos B disminuyó. El porcentaje de células CD11c positivas fue aproximadamente 3 veces mayor que en los testigos. Primero reconocimos una diferencia en el porcentaje de células dendríticas el día 5 después de la vacunación con MVA-BN, cuando el número de células CD11c positivas en el bazo de 4 testigos sin tratar fue de 3,6%, en comparación con 4,8% en 4 ratones vacunados con MVA-BN. La misma cantidad de MVA-BN inactivado con UV no causó ningún cambio significativo en las poblaciones de células después de la vacunación de los ratones neonatos en comparación con los testigos (no se muestran los datos). La dosis de vacunación inicial se eligió arbitrariamente. Después de la titulación del inóculo seleccionamos una dosis estándar de $2,5 \times 10^6$ DICT₅₀ para la vacunación (10 veces menos que en el experimento inicial). A esta dosis se indujeron los números máximos de CD (Tabla 2).

35

TABLA 1

40

Cambios inducidos en las células sanguíneas y esplénicas en ratones recién nacidos 1 semana después de la inmunización con $2,5 \times 10^7$ DICT₅₀ de MVA-BN

45

Parámetro %	Sangre			Bazo		
	NaCl	MVA-BN	P*	NaCl	MVA-BN	P*
Células totales x 10 ⁶				17,9±1,9	24,1 ±2,6	0,105
%CD11c	5,4±1,3	18,6±1,5	0,001	2,8±0,1	7,9±0,8	0,001
%CD11c/CD8α	0,5±0,1	2,7±0,3	0,001	1,1±0,1	4,6±0,7	0,002
%CD4/CD3	16,9±1,1	16,1±1,5	0,999	4,8±0,3	8,1±1,5	0,004
%CD8α/CD3	6,0±0,9	10,3±0,9	0,002	4,7±0,3	8,4±1,1	0,002
%NK1.1/DX5	16,4±1,2	24,4±3,3	0,032	2,5±0,3	2,4±0,2	0,862
%CD19/B220	22,3±0,5	8,4±0,8	0,001	16,2±1,3	8,6±0,9	0,004

65

* Prueba U de Mann Whitney

ES 2 288 609 T3

TABLA 2

Inducción de células CD11c positivas en el bazo de ratones wt de 1 día de edad y ratones con interrupciones génicas dentro de los 7 días posteriores al tratamiento con MVA.

Cepa del ratón	Dosis de MVA (DICT ₅₀)	%CD11c en controles	%CD11c en MVA- BN	relación
wt ^a	$2,5 \times 10^7$	2,8	7,9	2,8
wt	$2,5 \times 10^6$	2,1	11,9	5,6
wt	$2,5 \times 10^5$	2,5	6,6	2,6
RAG ^b	$2,5 \times 10^7$	4,2	5,4	1,3
AG129 ^c	$2,5 \times 10^3$	2,6	2,7	1,0
^a Wt = ratones C57BL/6 o 129 Sv/Ev. ^b Deleción en ratón RAG en el gen que activa la recombinación (es decir, ningún linfocito T y B funcional). ^c Interrupciones génicas en AG129 del receptor del IFN Tipo I (IFN- α y β) y Tipo II (IFN- γ).				

(ii) *MVA-BN induce preferentemente células dendríticas plasmacitoides (CDp)*

De acuerdo con otros autores las células CD11c positivas que también expresaron CD45RA o CD45R se consideraron CDp (Asselin-Paturel, *et al.* 2001, *Nat Immunol*, 12:1.144). Se planteó la pregunta de si MVA-BN inducía un aumento de CDp. Se llevó a cabo otro experimento en el cual también se analizaron CD45RA o CD45R en CD11c positiva. El porcentaje de células CD11c y CD45R doble positivas fue significativamente mayor en los ratones tratados con MVA-BN ($5,6 \pm 0,7\%$) que en ambos grupos testigo ($3,0 \pm 0,3\%$ sin tratar, $p = 0,01$; MVA-BN inactivado con UV $3,0 \pm 0,2\%$, $p = 0,006$. prueba U de Mann Whithney).

(iii) *Ratones neonatos tratados con MVA-BN elevaron sus niveles de Flt3-L sérico*

Flt3-L es un factor hematopoyético que produce mayores niveles de CD en los animales adultos. En los humanos y posiblemente en los ratones la fuente más rica de este factor son los linfocitos T activados. Para determinar si los números elevados de CD podrían ser el resultado de los Flt3-L inducidos, se comparó suero de ratón tratado con MVA-BN con el de los animales simuladamente tratados con relación a la presencia de este factor. Los animales tratados los días 2 y 5 tuvieron dos veces los niveles de Flt3-L en el suero en comparación con el suero de animales simuladamente tratados. En consecuencia, Flt3-L es uno de los factores que podrían ser responsables de números elevados de CD (Fig. 3)

Se evaluó el curso del tiempo de la inducción de Flt3-L en los ratones recién nacidos después de la administración de MVA-BN. En los recién nacidos, la vacunación con MVA-BN indujo un aumento de la concentración de Flt3-L en un plazo de 24 horas. La inducción alcanzó un máximo después de 48 horas y todavía estuvo presente el día 7, el momento en el que generalmente se analizaron las células esplénicas y se probó la resistencia contra HSV-1 (ver más adelante). En los ratones vacunados la concentración de Flt3-L en el suero aumentó al doble 24 horas y 48 horas después de la vacunación, en comparación con los animales testigo coincidentes en edad.

Ejemplo 2

(i) *Ratones neonatos tratados con MVA-BN sobrevivieron a la provocación con 100 a 500 DL₅₀ de HSV-1*

Se trataron grupos de ratones con la dosis estándar de MVA-BN uno o 2 días después del nacimiento y se provocaron a los 7 a 8 días de edad con 100 a 500 DL₅₀ del virus herpes simple 1 (HSV-1) (Fig. 4). Los ratones tratados con MVA-BN sobrevivieron a la provocación con HSV 1, mientras que todos los ratones testigo murieron dentro de los 5 a 6 días posteriores a la inoculación del virus de provocación.

Para respaldar aún más estas observaciones, se realizaron 9 experimentos de provocación con 40 ratones tratados con MVA-BN y 45 testigos. Más del 80% de los ratones tratados con virus sobrevivió a la provocación, mientras que todos los ratones testigo murieron (Fig. 5).

ES 2 288 609 T3

En otro conjunto de experimentos los ratones fueron tratados al nacer con MVA-BN ($2,5 \times 10^6$ DICT₅₀/ratón). El día 8 se realizó una provocación o con 10^3 (1 DL₅₀) o con 10^5 (100 DL₅₀) UFP de HSV-1. Después de la vacunación con MVA-BN 65% de los ratones sobrevivió a una dosis vírica que mató al 100% de los ratones testigo (100 DL₅₀) y un 90% sobrevivió a una dosis que mató al 45,5% de los testigos (1 DL₅₀). En otros experimentos un grupo de 7 ratones vacunados con MVA-BN inactivado con UV fueron infectados con HSV-1. Cinco de ellos murieron en el transcurso de 7 días. Los restantes 2 animales dejaron de crecer y murieron el día 22 y 29. Por consiguiente, los ratones tratados con MVA-BN alcanzaron un estado de mayor resistencia contra HSV-1 que se asoció a MVA-BN vivo, pero no a MVA-BN inactivado.

En los experimentos testigo realizados con ratones que no tienen linfocitos T funcionales se determinó que la protección contra HSV-1 después de la vacunación con MVA-BN no se debió a reacción cruzada de los linfocitos T citotóxicos inducidos por MVA-BN.

Se probó si las células dendríticas eran responsables de la protección de los ratones contra HSV-1 después de la vacunación con MVA-BN. Con este fin se provocó a ratones vírgenes de 8 días con 5×10^4 UFP de HSV-1 4 h después de la transferencia de células de ratones tratados con MVA. En un primer experimento se separaron los esplenocitos de los ratones de 8 días tratados cuando tenían 1 día de vida con MVA-BN en fracciones ricas en CD (de baja densidad) y fracciones pobres en CD (de alta densidad). Los ratones que recibieron 5×10^6 células de la fracción rica en CD sobrevivieron a la provocación en un 50% mientras que todos los ratones que recibieron 10 veces menos suspensión rica en CD o los ratones sin tratar murieron en el transcurso de 5 días. Un segundo enfoque se hizo transfiriendo células CD11c positivas positivamente aisladas de los ratones de 8 días tratados al día de vida con MVA-BN a ratones vírgenes coincidentes en edad. Una suspensión de 2×10^6 esplenocitos que contenía más del 80% de células CD11c positivas de los ratones tratados con MVA-BN protegió a los ratones vírgenes de la infección por HSV-1. En contraposición, 4 crías de la misma camada así como otros 8 animales sin tratar murieron después de la provocación. Además, los ratones que recibieron la misma cantidad de células esplénicas o los ratones que recibieron un equivalente esplénico (50×10^6 células) de la fracción negativa no mostraron mayor resistencia contra HSV-1. Por lo tanto las células CD11c positivas pueden proteger a los ratones contra HSV-1.

En el estado anterior de la técnica se describieron después de la administración de MVA efectos protectores a corto plazo en el rango de aproximadamente 24 horas (Vilsmeier, B., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112 (1999), 329-333). Aunque los virus usados en dicha publicación no son virus incapaces de replicarse para generar una descendencia viral infecciosa en el animal neonato o prenatal utilizado, se probó si el modo de acción según se divulga en Vilsmeier es similar al modo de acción descrito en la presente solicitud. Más en particular, Vilsmeier divulga que MVA, en particular MVA inactivado, induce una parainmunidad durante aproximadamente 24 horas. Para probar si el efecto de parainmunidad cuenta también para los efectos protectores según se divulga en la presente solicitud se vacunó a ratones a las 24 horas del nacimiento con MVA-BN o con MVA-BN inactivado. A los 7 días de edad se provocó a los ratones con una dosis letal de HSV-1 (10^5 UFP de HSF-1f). Los ratones testigo sin vacunar murieron 6 días después de la provocación. Tampoco los ratones vacunados con MVA-BN inactivado estuvieron protegidos contra la provocación con HSV-1. El número de células dendríticas en estos ratones no fue elevado. En contraposición, los ratones vacunados con MVA-BN sin inactivar estuvieron considerablemente protegidos contra una provocación con HSV-1. Treinta días después de la provocación más del 80% de los ratones todavía estaba vivo. Dos días después de la vacunación se encontró un elevado valor de Flt3-L sérico en el suero. Se encontraron valores elevados de CD en el bazo. El aumento de Flt3-L se asoció al número elevado de CD. Esto confirma que los efectos de parainmunidad no son responsables de la protección observada.

(ii) *MVA-BN induce una inmunidad específica en los neonatos que dura hasta la edad adulta*

Se vacunó (i.p.) a ratones C57BI/6 de 1 día de vida (tamaño del grupo de 18) con MVA-BN ($2,5 \times 10^7$ DICT₅₀). Cuatro semanas después de la vacunación, cuando los ratones se consideraron adultos se los provocó con una dosis letal (1×10^4 DICT₅₀) del virus Vaccinia Western Reserve (VV-WR). Con excepción de un animal todos los otros animales vacunados con MVA-BN sobrevivieron. En contraposición, todos los animales vacunados con placebo murieron en el transcurso de 7 días y mostraron síntomas clínicos graves como piel erizada, pérdida de peso y actividad reducida. Evidentemente esto es una demostración clara de que la vacunación con MVA-BN no sólo es segura en animales neonatos, sino que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra una infección por vaccinia letal (virus relacionado con MVA-BN).

REIVINDICACIONES

5 1. El uso del Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un animal neonato, incluido un ser humano, según el cual MVA es un virus que infecta abortivamente al animal neonato, incluido un ser humano, y en el que el tratamiento induce o mejora la maduración del sistema inmunitario.

10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, según el cual MVA es la cepa MVA-BN depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Salisbury (Reino Unido) con el número V00083008 o sus derivados, donde los derivados se **caracterizan** por (i) ser capaces de efectuar una replicación reproductiva en los fibroblastos de embriones de pollo (CEF) y en la línea celular de riñón de hámster bebé BHK pero son incapaces de efectuar una replicación reproductiva en una línea celular humana y (ii) por la ineptitud para replicarse en una cepa de ratones que es incapaz de producir linfocitos B y T maduros y como tales están gravemente inmunodeprimidos y sumamente vulnerables a un virus que se replica.

15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, según el cual la línea celular humana es HaCat o HeLa.

20 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, según el cual la mejora de la maduración del sistema inmunitario se correlaciona con un aumento del número de células dendríticas y de sus células precursoras.

25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, según el cual las células precursoras de las células dendríticas son precursoras de las células dendríticas plasmacitoides.

30 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, según el cual la mejora de la maduración del sistema inmunitario se correlaciona con un aumento de al menos 1,5 veces en la concentración de Flt3-L dos días después de la administración de MVA.

35 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, según el cual el medicamento se administra mediante aplicación oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intrauterina y/o subcutánea.

40 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, según el cual el medicamento se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz en una primera inoculación (“inoculación de sensibilización”) y en una segunda inoculación (“inoculación de refuerzo”).

45 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, según el cual el medicamento se administra al animal, incluido un ser humano, en una cantidad de al menos 10^1 DICT₅₀ (dosis infecciosa de cultivo tisular) de MVA.

50 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, según el cual el genoma del virus comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

55 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, según el cual la secuencia de ácido nucleico heteróloga se selecciona entre una secuencia que codifica al menos un antígeno, un epítipo antigénico y/o un compuesto terapéutico.

60 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, según el cual la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica una proteína seleccionada entre un interferón, IL-12, Flt3-L y GM-CSF.

50

55

60

65

Fig. 1A

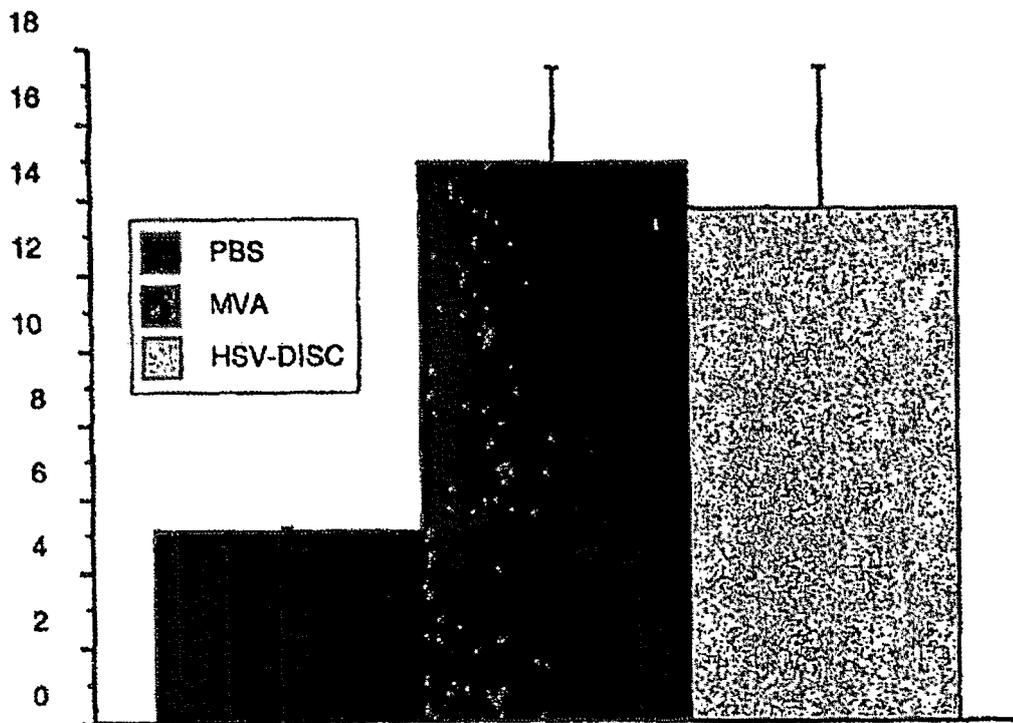


Fig. 1B

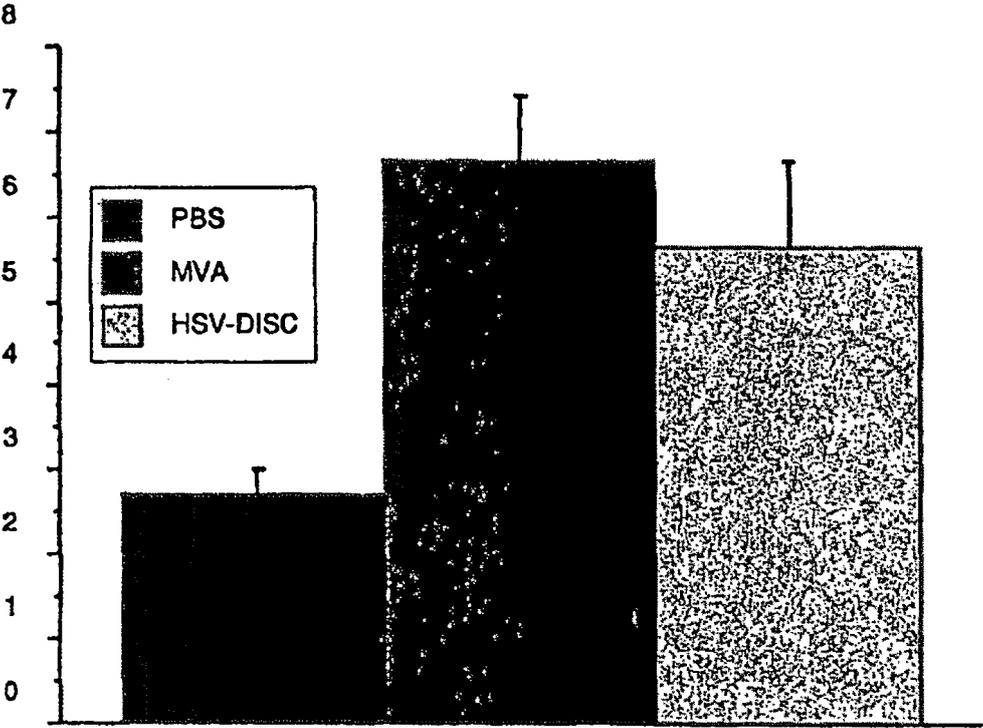
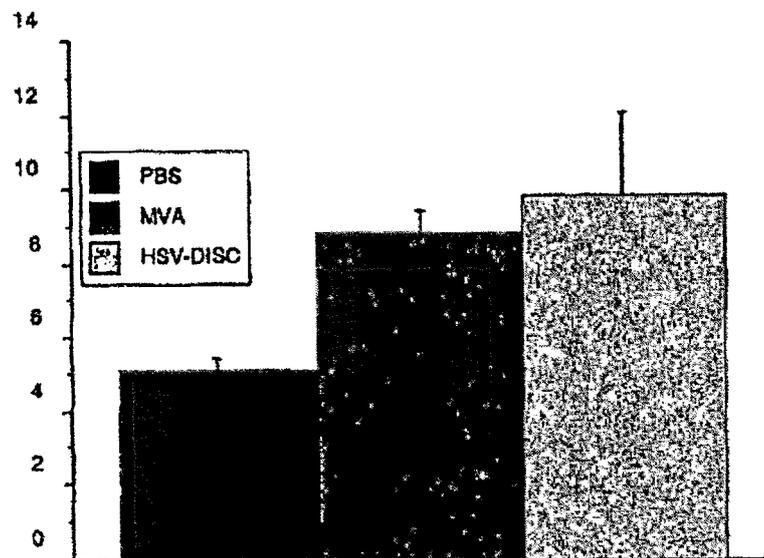


Fig. 1C



ES 2 288 609 T3

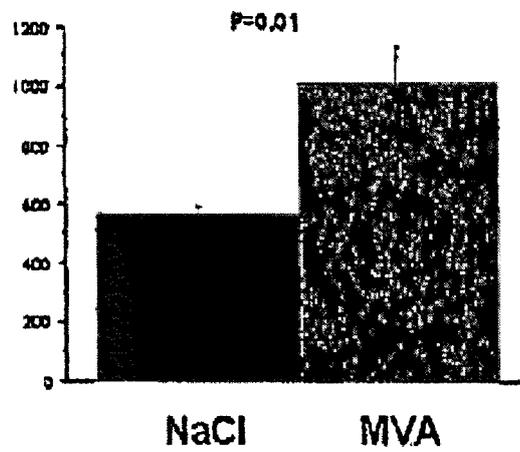
Figura 2:

Células CD11c en ratones de 2 semanas de edad después del tratamiento con MVA

Experimento BN9	n	sangre		bazo	
		% CD11c	% CD11c CD8	% CD11c	% CD11c CD8
virgen	3	3,5	0,4	4,9	1,3
1 Vacunación al nacer	3	7,4	2,1	16,1	2,0
1 vacunación el día 7	4	21,5	17,0	4,4	17,6
2 vacunaciones los días 0 y 7	4	42,7	35,6	27,9	25,7

Figura 3:

Flt3L conc. en suero de ratón de 8 días de edad.



Inyecciones de MVA los días 1 y 5

Figura 4:

Protección contra la infección letal

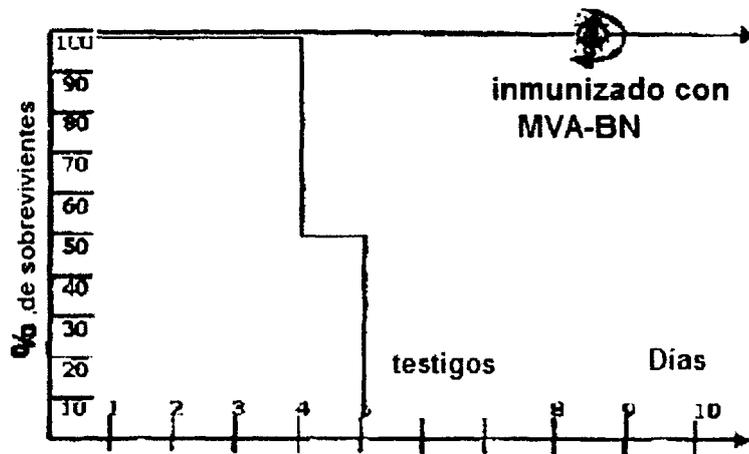


Figura 5:

9 experimentos de provocación con HSV-1

infectados sobrevivientes

Testigos	45	0
MVA	40	34

Figura 6:

