



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 000**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05856664 .7**

96 Fecha de presentación : **27.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1742668**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **Suministro secuencial de moléculas inmunogénicas mediante administraciones de un adenovirus y de un virus adeno-asociado.**

30 Prioridad: **28.04.2004 US 565936 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

73 Titular/es:
**The Trustees of the University of Pennsylvania
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, Pennsylvania 19104, US**

72 Inventor/es: **Wilson, James, M.**

74 Agente: **Pablos Riba, Julio de**

ES 2 361 000 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

5 Suministro secuencial de moléculas inmunogénicas mediante administraciones de un adenovirus y de un virus adeno-asociado

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El adenovirus es un virus con ADN de doble cadena, con un tamaño de genoma de aproximadamente 36 kilobases (kb), que ha sido ampliamente utilizado para aplicaciones de transferencia de gen debido a su capacidad para conseguir una transferencia de gen altamente eficiente en una diversidad de tejidos objetivo, y a su gran capacidad transgén. Convencionalmente, los genes E1 de adenovirus son borrados y sustituidos por un casete transgén consistente en el promotor de elección, secuencias de cADN del gen de interés y una señal poliA, dando como resultado un virus recombinante de replicación defectuosa.

15 Los adenovirus tienen una morfología característica con un cápside icosaédrico consistente en tres proteínas principales, hexón (II), pentón base (III) y una fibra con protuberancias (IV), junto con un número de otras proteínas menores, VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 [C. Russell, J. Gen Virol., 81: 2573-2604 (Nov. 2000)]. El genoma de virus es un ADN lineal, de doble cadena, que tiene repeticiones terminales invertidas (ITRs), con una proteína terminal fijada covalentemente a las terminaciones 5'. El ADN de virus está asociado íntimamente a la proteína VII altamente básica y a un pequeño péptido denominado mu. Otra proteína, V, está empaquetada con este complejo de proteína de ADN y proporciona un enlace estructural para el cápside por medio de la proteína VI. El virus contiene también una proteasa codificada en el virus, la cual es necesaria para procesar algunas de las proteínas estructurales para producir un virus infeccioso maduro.

20 Se han descrito adenovirus recombinantes para el suministro de moléculas a células anfitrión, para inducir una respuesta inmune. Véase la Patente US núm. 6.083.716, la cual proporciona vectores adenovirales a partir de adenovirus de dos chimpancés, C1 y C68 (también denominado Pan 9), y la Publicación de Patente Internacional núm. WO 02/33645 [Vectores derivados de Pan 5, Pan6, Pan7].

25 Lo que se necesita en el campo de las vacunas es un procedimiento de inmunización que induzca una fuerte respuesta inmune con respuestas mínimas para el portador de vacuna.

Sumario de la Invención

35 Los procedimientos divulgados incluyen suministrar secuencialmente uno o más gen(es) heterólogo(s) seleccionado(s) a un paciente mamífero por medio de un vector adenoviral y un vector de virus adeno-asociado. Cada uno de los vectores expresa el mismo producto inmunogénico o antigénico o un producto de reacción cruzada.

40 El procedimiento divulgado proporciona un incremento de la respuesta inmune al producto portado por los vectores virales.

Estas y otras realizaciones y ventajas de la invención se describen con mayor detalle en lo que sigue.

Breve Descripción de los Dibujos

45 La Figura 1 ilustra las respuestas IgG totales al GP de EboZ tras imprimación y potenciación heterólogas. Ratones B10Br fueron inmunizados IM con 5×10^{10} , 5×10^9 ó 5×10^8 partículas/ratón de vector H5GP. Seis semanas más tarde, los ratones fueron potenciados IM con 5×10^{10} copias de genoma/ratón de vector AAV2/1GP. Se recogió suero a partir de 3 ratones de cada grupo y se agrupó en un momento cualquiera de entre 42 días después de la inyección (pre-potenciación), o 1 semana después de la potenciación, o 2 semanas después de la potenciación, según se indica en la Figura. Las respuestas IgG totales al GP fueron medidas mediante ELISA.

Descripción Detallada de la Invención

55 La invención se refiere a un procedimiento para inducir específicamente una respuesta inmune mediante administración de un vector de virus adeno-asociado (AAV). Cada uno de los vectores virales contiene un casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias reguladoras de control con expresión directa del producto. En una realización, los productos codificados son del mismo orden para proporcionar un efecto de imprimación/ potenciación del producto, que induce inmunidad al patógeno del que se deriva el producto o a un patógeno de reacción cruzada. Sin embargo, los elementos de control regulador y otros elementos virales pueden ser diferentes en los adenovirus administrados. En otra realización, los productos codificados difieren, pero proporcionan un efecto de reacción cruzada.

Inesperadamente, los inventores han encontrado que se observa una respuesta significativa específica al antígeno en un régimen que incluye administración secuencial mediada de rAd y mediada de rAAV del antígeno. Sin pretender quedar vinculados por la teoría, se estima que se puede observar una respuesta de células T incrementada, dependiendo del antígeno y de la vía de administración.

Así, el procedimiento incluye administración secuencial de un vector adenoviral portador de un casete de expresión heteróloga y de un vector AAV portador de un casete de expresión heteróloga, según se describe en la presente memoria. Según se utiliza en la presente memoria, la administración secuencial abarca el suministro de un vector adenoviral seguido del suministro de un vector AAV, *es decir*, en períodos de tiempo separados uno del otro. La administración secuencial abarca además el suministro de un vector AAV seguido del suministro de un vector adenoviral. El procedimiento abarca también la coadministración de un vector adenoviral y de un vector AAV, *es decir*, la administración simultánea o en una relación de proximidad cercana en el tiempo de cada uno con el otro, tanto si se formulan conjuntamente como por separado. En una realización, el suministro secuencial del producto antigénico puede ser efectuado incluso con la coadministración de diferentes vectores debido a la cinética de la expresión de antígeno a través de uno de los vectores, del uso de un promotor inducible, o de cualquier otro sistema de expresión activable.

En una realización, el régimen de inmunización proporciona la administración de múltiples vectores adenovirales en combinación con la administración secuencial de un vector AAV según se describe en la presente memoria. En otra realización, el régimen proporciona la administración de un vector adenoviral con la administración secuenciada de múltiples vectores AAV. Todavía en otra realización, el régimen proporciona la administración secuencial de múltiples vectores adenovirales en combinación con múltiples vectores AAV.

Un régimen que incluye la administración de más de un vector adenoviral utiliza típicamente un primer vector adenoviral que tiene una proteína de cápside de un primer serotipo, y la administración de al menos un vector adenoviral adicional que tiene una proteína de cápside que es inmunológicamente distinta a la del (de los) vector(es) adenoviral(es) anterior(es).

Según se utiliza en la presente memoria, una proteína de cápside es inmunológicamente distinta de la proteína de otro cápside si puede ser administrada a un sujeto en ausencia de una respuesta inmune que impida la infección con una segunda proteína de cápside (*por ejemplo*, una respuesta de anticuerpo de neutralización de clarificación). De manera adecuada, las proteínas de cápside de un(os) vector(es) de potenciación son procedentes de una fuente serológicamente distinta de la proteína de cápside del (de los) vector(es) previamente administrado(s) (imprimación). Sin embargo, en otras realizaciones, las proteínas de cápside de los vectores de imprimación (y opcionalmente, de potenciación), pueden ser administrados sin relación con la distintividad serológica, si los epítopes de anticuerpo naturales de las proteínas de cápside están enmascarados, modificados, o neutralizados de otro modo (*por ejemplo*, mediante coadministración de una molécula exógena).

De forma similar, un régimen que incluye la administración de más de un vector AAV utiliza típicamente un primer vector AAV que tiene una proteína de cápside de un primer serotipo y la administración de al menos un vector AAV adicional que tiene una proteína de cápside que es inmunológicamente distinta a la(s) del (de los) vector(es) AAV anteriores.

Dependiendo de las vías de administración deseadas, un experto en la materia puede seleccionar un régimen apropiado. Por ejemplo, un pico de respuesta inmune se observa por lo general alrededor de 10 a 14 días después de un suministro mediado de Ad. Sin embargo, la potenciación a continuación de este pico puede generar un segundo pico. De ese modo, puede resultar deseable que la expresión en el tiempo de un antígeno de potenciación se exprese a partir de alrededor de 10 a 21 días, o de 18 a 28 días, o de 28 días a 6 meses a continuación del suministro mediado de Ad. En otro ejemplo, determinados serotipos de AAV demuestran expresión de pico alrededor de 3 a 4 semanas después del suministro. De ese modo, se puede estimar en el tiempo que la potenciación a continuación del suministro de AAV expresa el antígeno, o un antígeno de reacción cruzada, alrededor desde 3 semanas a alrededor de 4 semanas, desde alrededor de 4 semanas a alrededor de 2 meses, o desde alrededor de 2 meses a alrededor de 6 meses, o más, a continuación del suministro de AAV.

En una realización, el casete de expresión heteróloga suministrado por medio de un vector viral, *por ejemplo*, un vector AAV, contiene un producto inmunogénico enlazado operativamente a un promotor inducible o regulable. Cuando se utiliza en un régimen conforme a la presente invención, el agente de inducción o regulación se administra típicamente de tal modo que la expresión del producto se activa de forma inmediata tras la administración del vector viral. A continuación, la expresión puede ser extinguida mediante extracción del agente de inducción o de regulación. El régimen puede incluir activación de "pulso" de la expresión. De ese modo, el procedimiento permite que la expresión sea inducida, extinguida, e inducida nuevamente después tras un período de tiempo. En otra realización, la expresión es inducida, no tras la administración, sino entre varios días y varias semanas después de la administración. Esta realización puede permitir el co-suministro de un Ad y de un AAV seguido de inducción (activación) varias semanas después del suministro, dependiendo del retardo causado por el agente de inducción. Por ejemplo, una vez que se ha suministrado el agente de inducción, pueden pasar de 7 a 10 días, o más, antes de

que se observe el efecto. Un experto en la materia podrá estar familiarizado con el retardo entre el suministro del agente de inducción o de activación y el efecto, y estará capacitado para factorizar éste fácilmente en el régimen seleccionado.

- 5 Opcionalmente, se puede combinar un régimen con la administración de otras porciones inmunogénicas o terapéuticas que incluyan, *por ejemplo*, moléculas de ADN que codifican una molécula inmunogénica o terapéutica deseada, o un inmunógeno o sustancia terapéutica a base de proteína.

Estos y otros aspectos del régimen de la invención, y los productos, van a ser descritos con mayor detalle.

10

I. Vectores Adenovirales

- 15 El término “borrado de funcionalidad” significa que se extrae o se daña de otro modo una cantidad suficiente de la región de gen, *por ejemplo*, mediante mutación o modificación, de modo que la región de gen ya no está capacitada para la producción de productos funcionales de expresión de gen. Si se desea, se puede extraer la región de gen completa. Otros sitios adecuados para la rotura o borrado de gen se discuten en otras partes de la solicitud.

A. Serotipos

- 20 De manera adecuada, los vectores adenovirales de la invención contienen uno o más elementos adenovirales derivados de un genoma adenoviral seleccionado. En una realización, los vectores contienen repeticiones adenovirales de terminal invertido (ITRs) procedentes de un serotipo seleccionado y de secuencias adenovirales adicionales del mismo serotipo adenoviral. En otra realización, los vectores contienen secuencias adenovirales que se derivan de un serotipo adenoviral diferente del que proporciona las ITRs. Según se define en la presente memoria, un adenovirus seudotipado se refiere a un adenovirus en el que la proteína de cápside del adenovirus procede de un serotipo diferente del serotipo que proporciona las ITRs.

- 30 La selección del serotipo de las ITRs, de genes cualesquiera adenovirales presentes, de la proteína de cápside y del serotipo de cualesquiera otras secuencias adenovirales presentes en el vector, no es una limitación de la presente invención. Una diversidad de cepas adenovirales se encuentran disponibles en la American Types Culture Collection, Manassas, Virginia, o disponibles mediante demanda en una diversidad de fuentes comerciales e institucionales. Además, Las secuencias de muchas de tales cepas están disponibles a partir de una diversidad de bases de datos incluyendo, *por ejemplo*, PubMed y GenBank. Vectores de adenovirus preparados a partir de otros adenovirus de simios o de humanos, se encuentran descritos en la literatura publicada [véase, por ejemplo, la Patente US núm. 5.240.846]. Las secuencias de ADN de un número de tipos de adenovirus están disponibles en la base de datos de GenBank™, incluyendo el tipo AdS [GenBank™ Accession No. M73260]. Las secuencias de adenovirus pueden ser obtenidas a partir de cualquier serotipo de adenovirus conocido, tal como los serotipos C, D, 1 – 40, y en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 40, e incluyendo además cualquiera de los tipos humanos actualmente identificados. De forma similar, se pueden emplear también adenovirus que se sabe que infectan a animales no humanos (*por ejemplo*, los simios), para las construcciones vectoriales de la presente invención. Véase, *por ejemplo*, la Patente US núm. 6.083.718. Ejemplos de otro serotipo de adenovirus que puede ser útil en el procedimiento de la invención incluyen, *por ejemplo*, el serotipo 34 [documento 2004/4097016], el serotipo 24 [documento WO 2004/083418], y el serotipo 35 [documento EP 1054064].

- 45 Las secuencias virales, los virus auxiliares, si se necesitan, y otros componentes de vector y secuencias empleadas en la construcción de los vectores descritos en la presente memoria, son susceptibles de obtención según se ha descrito en lo que antecede. Las secuencias de ADN de las secuencias de adenovirus de simio se emplean para construir vectores y líneas de células útiles en la preparación de tales vectores.

- 50 En una realización, al menos uno de los adenovirus utilizados en la invención contiene un cápside derivado de un primate no humano. Ejemplos de secuencias adecuadas de primate no humano incluyen adenovirus de simios, tales como Pan5 (también C5), Pan6 (también C6), Pan7 (también C7), SV1, SV25, SV39 [véase el documento WO 02/33645], y Pan 9 (también C68) y C1 [Patente US núm. 6.083.716], y SA18 [documento WO 2005/001103].

- 55 La invención se refiere además a vectores adenovirales de adenovirus seudotipados, quiméricos e híbridos. Véase, *por ejemplo*, el documento WO 2005/001103.

Sin embargo, la descripción no se limita a la selección de un serotipo de cápside o del origen de los otros elementos adenovirales presentes en el vector viral.

60

B. Elementos Adenovirales

Las partículas o los vectores adenovirales utilizados en la presente invención están compuestos por cápsides de adenovirus que tienen empaquetados en los mismos un casete de expresión portador de un producto que ha de ser expresado en el anfitrión, y elementos virales suficientes para permitir el suministro del casete de expresión a una

célula anfitrión infectada. Los vectores adenovirales pueden ser de replicación defectuosa, evitando con ello la replicación en una célula anfitrión.

5 En una realización, las partículas adenovirales utilizadas en la invención contienen elementos cis adenovirales 5' y elementos cis adenovirales 3' en las terminaciones extremas 5' y 3' del adenovirus, respectivamente. El extremo 5' del genoma adenoviral contiene elementos cis 5' necesarios para el empaquetamiento y la replicación, *es decir*,
10 secuencias de repetición de terminal invertido (ITR) 5' (las cuales funcionan como orígenes de replicación), y dominios 5' incrementadores de empaquetamiento (que contienen las secuencias necesarias para empaquetar genomas Ad lineales y elementos incrementadores para el promotor E1). El extremo 3' del genoma adenoviral incluye los elementos cis 3' (incluyendo las ITRs) necesarios para el empaquetamiento y la encapsidación.

15 Los vectores adenovirales pueden contener genes adenovirales funcionales naturales para un genoma adenoviral, o pueden contener múltiples borrados en relación con un genoma adenoviral natural. En una realización, el adenovirus posee un borrado funcional en la región E1 que hace que su replicación sea defectuosa e incapaz de expresar los productos de gen de esta región, incluyendo los productos de gen E1a y E1b.

20 Adicionalmente, los vectores adenovirales utilizados en la invención pueden ser borrados funcionalmente en una o más de las otras regiones de gen adenoviral temprano. Por ejemplo, un vector adenoviral utilizado en la invención puede contener un borrado funcional en la región E1 y, opcionalmente, un borrado funcional en una o más de las regiones de adenovirus E2, de la región de adenovirus E3, o de la región de gen de adenovirus E4. Los borrados funcionales en la región E2 pueden incluir la destrucción de la capacidad para expresar una o ambas funcionalidades del producto E2, del E2a y del E2b. De forma similar, un borrado funcional en la región E4 puede incluir la destrucción de la capacidad para expresar los productos funcionales de gen ORF1, ORF2, ORF3, ORF4,
25 ORF5, ORF6, ORF7.

30 La eliminación de E3 permite la inserción de un casete de expresión en esa región. Sin embargo, se cree que E3 está implicado en la modulación de la respuesta inmune del anfitrión al adenovirus, y de ese modo, en otra realización, se mantiene. En esta realización, el producto de gen E3 es expresado bajo el control del promotor heterólogo, para evitar el descenso de regulación del promotor natural de E3 que requiere expresión de E1.

35 Los adenovirus utilizados en la invención que contienen un borrado de E4, son borrados funcionalmente de uno o más de los bloques de lectura abiertos (ORFs) de E4 (*por ejemplo*, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7). En una realización, la construcción contiene un borrado funcional de cada uno de los ORFs de E4. En otra realización, todos los ORFs de E4 son borrados con excepción del E4 ORF6. Todavía en otra realización, se borra funcionalmente otra combinación de uno o más de estos ORFs de E4 en la construcción adenoviral utilizada en el procedimiento.

40 Un vector adenoviral usado en la invención puede estar funcionalmente borrado en una o más de otras regiones de gen adenoviral, *por ejemplo*, en uno o más de los genes adenovirales intermedios, los genes IX y IVa₂, o los genes adenovirales finales (L1, L2, L3, L4 y L5).

45 Todavía según otra realización, se pueden hacer otros borrados en otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Estos borrados pueden ser utilizados individualmente, *es decir*, una secuencia de adenovirus para su uso en la presente invención puede contener borrados en una sola región únicamente.

Los procedimientos para generar vectores adenovirales que contienen borrados funcionales que eliminan la capacidad del vector para expresar proteínas requeridas para su empaquetamiento en un cápside adenoviral, son conocidos por los expertos en la materia y no constituyen una limitación de la presente invención.

50 C. Elementos de Vector

Los procedimientos empleados para la selección del objetivo antigénico o inmunogénico (*es decir*, el producto) y las secuencias de codificación del mismo, la clonación y la construcción del "casete de expresión heteróloga" y su inserción en el vector viral, están al alcance de un experto en la materia dadas las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria. De acuerdo con la presente invención, el casete de expresión heteróloga puede estar localizado en cualquier región adenoviral en relación con un genoma adenoviral natural, el cual se localiza entre las ITRs 5' y 3' del adenovirus. En una realización, el casete de expresión heteróloga se localiza en la región E1 natural del vector adenoviral. En otra realización, el casete de expresión heteróloga se localiza en la región E3 natural. En otras realizaciones, el producto de gen se expresa a partir de la región E2 natural del vector adenoviral o a partir de la región E4 natural del vector adenoviral, y está operativamente enlazado a elementos de control regulatorio que no son contiguos con la secuencia que codifica el producto de gen. La invención no está limitada a la orientación del casete de expresión heteróloga, el cual puede estar insertado en 5'-3' o en 3'-5', en relación con la orientación del genoma adenoviral que flanquea al casete de expresión.

Todavía en otra realización, el vector adenoviral porta más de un casete de expresión heteróloga, el cual puede ser insertado en múltiples sitios de borrado en el genoma adenoviral. En la presente realización, el casete de expresión heteróloga puede expresar un mismo, o diferentes, producto(s) desde múltiples posiciones en el genoma adenoviral.

5 1. La Secuencia de Ácido Nucleico

El casete de expresión contiene una secuencia de ácido nucleico, heteróloga respecto a las secuencias de vector que flanquean la secuencia, que codifica un polipéptido, una proteína, u otro producto de interés. De manera adecuada, el producto es inmunogénico o antigénico. La secuencia de codificación de ácido nucleico está enlazada operativamente a componentes reguladores de una manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión del producto en una célula anfitrión. Secuencias de ácido nucleico y productos adecuados, pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia. La selección de estos elementos no es una limitación de la presente invención.

15 2. Elementos Regulatorios

Además de los elementos principales identificados en lo que antecede para el casete de expresión, el vector incluye también elementos de control convencionales que están enlazados operativamente a las secuencias que codifican el producto de una manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión del producto en una célula infectada con el virus utilizado en la invención. Según se usa en la presente memoria, las secuencias "operativamente enlazadas" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas con el producto de interés (*por ejemplo*, el gen), como secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de iniciación, terminación, promotor e incrementador de transcripción apropiadas; señales de procesamiento eficiente de ARN tal como señales de enlace y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el mRNA citoplásmico; secuencias que aumentan la eficacia de traducción (*es decir*, secuencias de consenso de Kozak); secuencias que aumentan la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que aumentan la secreción del producto codificado. Un gran número de secuencias de control de expresión, incluyendo los promotores que son naturales, constitutivos, inducibles y/o específicos del tejido, son conocidas en el estado de la técnica y pueden ser utilizadas.

Ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR retroviral del virus del sarcoma de Rous (RSV) (opcionalmente con el incrementador de RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el incrementador de CMV y/o la región intrónica de CMV) [véase, *por ejemplo*, Boshart et al., Cell, 41: 521-530 (1985)], el promotor SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina y sus variantes, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK), y el promotor de EF1 α [Invitrogen]. En una realización, en la que el antígeno es un antígeno de coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), se utiliza el promotor de β -actina en combinación con un incrementador y regiones intrón del CMV.

En otra realización, se utilizará el promotor natural para el gen. El promotor natural puede ser preferido cuando se desea que la expresión del producto sea una expresión mimética natural. El promotor natural puede ser utilizado cuando la expresión del producto debe ser regulada temporalmente o experimentalmente, de una manera específica del tejido, o en respuesta a estímulos de transcripción específicos. En una realización adicional, se pueden utilizar también otros elementos de control de expresión natural, tal como elementos incrementadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak, para mimetizar la expresión natural.

Otra realización del casete de expresión incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto enlazado operativamente a un promotor específico del tejido. Por ejemplo, si se desea expresión en el músculo esquelético, se debe utilizar un promotor que sea activo en el músculo. Éste incluye los promotores procedentes de genes que codifican la β -actina esquelética, la cadena 2A ligera de miosina, la distrofina, la creatina quinasa muscular, así como los promotores musculares sintéticos con actividades más altas que los promotores que se producen de forma natural (véase Li et al., Nat. Biotech., 17: 241-245 (1999)). Se conocen otros ejemplos de promotores para el hígado que son específicos del tejido [albúmina, Miyatake et al., J. Virol., 71: 5124-32 (1997); promotor nuclear del virus de la hepatitis B, Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996); alfa-fetoproteína (AFP), Arbutnot et al., Hum. Gene Ther., 7: 1503-14 (1996), osteocalcina ósea [Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24: 185-96 (1997)]; sialoproteína ósea [Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11: 654-64 (1996)], linfocitos [CD2, Hansai et al., J. Immunol., 161: 1063-8 (1998); Cadena pesada de inmonoglobulina; Cadena receptora de células T]; neuronales tal como el promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13: 503-15 (1993)), el gen neurofilamento de cadena ligera (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88-5611-5 (1991)), y el gen vgf específico de neurona (Piccioli et al., Neuron, 15: 373-84 (1995)), entre otros.

Opcionalmente, los vectores portadores de secuencias que codifican productos inmunogénicos pueden incluir también genes informadores o marcadores seleccionables que pueden incluir secuencias que codifican resistencia a la gentamicina, higromicina o puromicina, entre otros. Tales genes informadores o marcadores seleccionables

(preferentemente posicionados por fuera del genoma viral que ha de ser empaquetado en una partícula viral), pueden ser utilizados para señalar la presencia de los plásmidos en las células bacterianas, tal como resistencia a la ampicilina. Otros componentes del vector pueden incluir un origen de replicación. La selección de estos y otros promotores y elementos de vector es convencional para los expertos en la materia, y muchas de esas secuencias se encuentran disponibles [véase, *por ejemplo*, Sambrook et al., y las referencias citadas en la presente memoria].

Estos vectores se generan utilizando las técnicas y secuencias proporcionadas en la presente memoria, junto con técnicas conocidas por los expertos en la materia. Tales técnicas incluyen técnicas de clonación convencionales de cADN, tal como las descritas en textos [Sambrook et al., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio*, Cold Spring Harbor Pres, Cold Spring Harbor, NY], el uso de secuencias de oligonucleótido de solapamiento de los genomas de adenovirus, reacción de cadena de polimerasa, y cualquier procedimiento adecuado que proporcione la secuencia de nucleótido deseada.

Según se ha expuesto en lo que antecede, mientras que en una realización el régimen de inmunización incluye el suministro secuencial del mismo producto inmunogénico a través de diferentes vectores virales, el (los) casete(s) de expresión heteróloga utilizado(s) en los vectores de cualquier régimen dado, no necesita(n) ser el mismo. De hecho, cada casete de expresión heteróloga puede contener secuencias reguladoras para el producto inmunogénico y/o elementos de vector que difieren de las secuencias reguladoras y del elemento de vector de otros casetes de expresión utilizados en el régimen. De ese modo, la selección de estos elementos reguladores y de vector no es una limitación de la invención, incluso dentro del contexto de un régimen de inmunización para un sujeto seleccionado.

II. Partículas Adenovirales

Los expertos en la materia son conocedores de una diversidad de procedimientos de producción para partículas adenovirales. La selección de procedimientos de producción apropiados no es una limitación de la presente invención. Véase, *por ejemplo*, la Patente US núm. 6.083.716; la Publicación de Patente Internacional núm. WO 02/33645. De forma resumida, la producción de un vector adenoviral que carezca de la capacidad de expresar uno o más productos adenovirales esenciales (*por ejemplo*, E1a, E1b, E2a, E2b, ORF6 de E4, L1, L2, L3, L4 y L5) puede ser cultivada en presencia de productos del gen adenoviral faltante que sean requeridos para la infectividad viral y la propagación de una partícula adenoviral. Estas funciones auxiliares pueden ser proporcionadas cultivando el vector adenoviral en presencia de una o más construcciones adenovirales (*por ejemplo*, un plásmido o un virus) y/o una célula anfitrión de empaquetamiento. Véanse, *por ejemplo*, las técnicas descritas para la preparación de un vector Ad humano "minimal" en la Publicación de Patente Internacional núm. WO 96/13597, publicada el 9 de Mayo de 1996.

Con independencia de si los vectores adenovirales contienen solamente las secuencias Ad minimales, o el genoma Ad completo solamente con borrados funcionales en las regiones E1, E3 y/o E4, en una realización, el virus recombinante contiene un cápside derivado de un solo adenovirus. Alternativamente, en otras realizaciones, se pueden utilizar adenovirus seudotipados recombinantes o adenovirus híbridos en los procedimientos. Se han descrito procedimientos para producir estos vectores adenovirales.

A. Virus Auxiliares

Así, dependiendo del contenido de gen de adenovirus de los vectores virales empleados para portar el casete de expresión, se puede hacer necesario un fragmento de virus auxiliar o de virus no-replicante para proporcionar suficientes secuencias de gen de adenovirus necesarias para producir una partícula viral recombinante infecciosa que contenga el casete de expresión. Los virus auxiliares útiles contienen secuencias de gen de adenovirus seleccionadas no presentes en la construcción de vector de adenovirus y/o no expresadas por la línea de células de empaquetamiento a las que es transferido el vector. En una realización, el virus auxiliar es de replicación defectuosa y contiene una diversidad de genes de adenovirus adicionalmente a las secuencias descritas en lo que antecede. Un virus auxiliar de ese tipo se utiliza deseablemente en combinación con una línea de células de expresión de E1.

Los virus auxiliares pueden ser conformados también según conjugados poli-catión tal y como se describe en Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 16985-16987 (1989); K. J. Fischer y J. M. Wilson, *Biochem. J.*, 299: 49 (1 de Abril de 1994). Los virus auxiliares pueden contener opcionalmente un segundo casete de expresión informador. Un número de tales genes informadores son conocidos en el estado de la técnica. La presencia de un gen informador sobre el virus auxiliar que sea diferente del producto de gen sobre el vector de adenovirus, permite que tanto el vector Ad como el virus auxiliar sean monitorizados independientemente. Este segundo informador se utiliza para facilitar la separación entre el virus recombinante resultante y el virus auxiliar tras la purificación.

B. Líneas de Células de Complementación

Para generar adenovirus (Ad) recombinantes borrados en cualquiera de los genes descritos en lo que antecede, la función de la región de gen borrado, si es esencial para la replicación y la infectividad del virus, debe ser suministrada al virus recombinante por medio de un virus o una línea auxiliar de células, es decir, una línea celular

de complementación o empaquetamiento. En muchas circunstancias, se puede utilizar una línea de células que exprese el adenovirus humano E1 para transcomplementar el vector Ad de chimpancé. Esto resulta particularmente ventajoso puesto que, debido a la diversidad entre las secuencias de Ad de chimpancé de la invención y las secuencias E1 de Ad humano, encontrada en las células de empaquetamiento actualmente disponibles, el uso de células que contienen E1 humano corriente impide la generación de adenovirus competentes para la replicación durante el proceso de replicación y producción. Sin embargo, en determinadas circunstancias, puede ser deseable utilizar una línea de células que exprese los productos del gen E1 que pueden ser utilizados para la producción del adenovirus de simio borrado en E1. Tales líneas de células han sido ya descritas. Véase, *por ejemplo*, la Patente US núm. 6.083.716.

Se podrían utilizar las secuencias proporcionadas en la presente memoria para generar una célula o una línea de células de empaquetamiento que exprese, como mínimo, el gen E1 de adenovirus bajo el control transcripcional de un promotor para expresión en una línea de células madre seleccionada. Se pueden emplear promotores inducibles o constitutivos para esta finalidad. Ejemplos de tales promotores han sido descritos con detalle en otras partes de esta especificación. Se selecciona una célula madre para la generación de una nueva línea de células que exprese cualquier gen de Ad deseado. Sin limitación, una línea de células madre de ese tipo podrían ser las células HeLa [ATCC Accession núm. CCL 2], A549 [ATCC Accession núm. CCL 185], HECK 293, KB [CCL 17], Detroit [*por ejemplo*, Detroit 510, CCL 72], y WI-38 [CCL 75], entre otras. Estas líneas celulares se encuentran disponibles en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas de células madre adecuadas pueden ser obtenidas a partir de otras fuentes.

Tales líneas de células de expresión de E1 son útiles en la generación de vectores borrados en E1 de adenovirus recombinante. Adicionalmente, o alternativamente, la invención se refiere a líneas de células que expresan uno o más productos de gen adenoviral de simio, *por ejemplo*, E1a, E1b, E2a y/o ORF6 de E4, que pueden ser construidos utilizando esencialmente los mismos procedimientos, para su uso en la generación de vectores virales de simio recombinantes. Tales líneas de células pueden ser utilizadas para transcomplementar vectores de adenovirus borrados en los genes esenciales que codifican esos productos. La preparación de una célula anfitrión conlleva técnicas tales como el ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede ser llevado a cabo utilizando técnicas de clonación directa. Tales técnicas han sido ya descritas [G. Gao et al., Gene Ther., Octubre de 2003; 10(22): 1926-1930; Publicación de Patente US núm. 2003-0092161-A, publicada el 15 de Mayo de 2003]. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas tales como clonación de cADN y genética, que son bien conocidas y que están descritas por Sambrook et al., mencionado anteriormente, y la utilización de secuencias de oligonucleótido de solapamiento de los genomas de adenovirus, combinadas con procedimientos sintéticos, de reacción de cadena de polimerasa, y cualesquiera otros procedimientos adecuados que proporcionen la secuencia de nucleótido deseada.

Todavía según otra alternativa, los productos de gen adenovirales esenciales son proporcionados en *trans* por el vector adenoviral y/o el virus auxiliar. En ese caso, se puede seleccionar una célula anfitrión adecuada a partir de cualquier organismo biológico, incluyendo las células procarióticas (*por ejemplo*, bacterianas), y las células eucarióticas, incluyendo las células de insectos, las células de levadura y las células de mamífero. Las células anfitrión se seleccionan a partir de cualesquiera especies de mamíferos, incluyendo, sin limitación, células tales como las células A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, HEK 293 o PERC6 (todas las cuales expresan E1 adenoviral funcional) (Fallaux, FJ et al., (1998), Hum Gene Ther, 9; 1909-1917], Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblasto primario, células hepatocito y mioblasto derivadas de mamíferos que incluyen los humanos, el mono, el ratón, la rata, el conejo y el hámster. La selección de las especies de mamíferos que proporcionan las células no constituye una limitación de la invención; ni tampoco el tipo de célula de mamífero, es *decir*, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral, etc.

C. Ensamblaje de Partícula Viral y Transfección de una Línea de Células

En general, cuando se suministra el vector que comprende el casete de expresión mediante transfección, el vector es suministrado en una cantidad que va desde alrededor de 5 µg a alrededor de 100 µg de ADN, o desde alrededor de 10 a alrededor de 50 µg de ADN a alrededor de 1×10^4 células a alrededor de 1×10^{13} células, o alrededor de 10^5 células. Sin embargo, se pueden ajustar las cantidades relativas de vector ADN respecto a las células anfitrión, tomando en consideración factores tales como el vector seleccionado, el procedimiento de suministro y las células anfitrión seleccionadas.

El vector puede ser cualquier vector conocido en el estado de la técnica o divulgado en lo que antecede, incluyendo ADN sin protección, plásmido, fago, transposón, cósmidos, episomas, virus, etc. La introducción del vector en la célula anfitrión puede ser lograda mediante cualquier medio conocido en el estado de la técnica o según se ha divulgado en lo que antecede, incluyendo la transfección, y la infección. Uno o más de los genes adenovirales puede(n) estar establemente integrado(s) en el genoma de la célula anfitrión, expresado(s) establemente como episoma(s), o expresado(s) transitoriamente. Los productos de gen pueden ser todos expresados transitoriamente, sobre un episoma o integrados establemente, o algunos de los productos de gen pueden ser expresados establemente mientras otros son expresados transitoriamente.

- Además, los promotores para cada uno de los genes adenovirales pueden ser seleccionados de forma independiente a partir de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenoviral natural. Los promotores pueden ser regulados, por ejemplo, mediante un estado fisiológico específico del organismo o la célula (es decir, mediante el estado de diferenciación o en células replicantes o quiescentes) o mediante factores exógenamente añadidos, por ejemplo. La introducción de las moléculas (*por ejemplo*, plásmidos o virus) en la célula anfitrión, puede ser realizada también utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia y según se ha discutido a través de la descripción. En la realización preferida, se utilizan técnicas de transfección estándar, *por ejemplo*, transfección de CaPO₄ o electroporación.
- 5 El ensamblaje de las secuencias de ADN seleccionadas del adenovirus (así como también del transgén y de otros elementos de vector) en varios plásmidos intermedios, y el uso de los plásmidos y vectores para producir una partícula viral recombinante, se consigue en todos los casos utilizando técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen técnicas convencionales de clonación de cADN tales como las descritas en los textos [Sambrook et al., mencionado anteriormente], el uso de secuencias solapantes de nucleótido de los genomas de adenovirus, reacción de cadena de polimerasa, y cualquier procedimiento adecuado que proporcione la secuencia de nucleótido deseada. Se emplean técnicas estándar de transfección y de co-transfección, *por ejemplo*, técnicas de precipitación de CaPO₄. Otros procedimientos convencionales empleados incluyen recombinación homóloga de los genomas virales, formación de placas de virus en capas de agar, procedimientos de generación de señales de medición, y similares.
- 10 Por ejemplo, siguiendo la construcción y ensamblaje del vector viral que contiene el casete de expresión deseado, el vector es transfectado *in vitro* en presencia de un virus auxiliar en la línea de células de empaquetamiento. La recombinación homóloga se produce entre las secuencias auxiliar y de vector, lo que permite que las secuencias de adenovirus-transgén del vector sean replicadas y empaquetadas en cápside de virión, dando como resultado partículas de vector viral recombinante. El procedimiento actual para producir tales partículas de virus está basado en transfección. Sin embargo, la invención no se limita a tales procedimientos.
- 15
- 20
- 25

Los virus recombinantes resultantes son útiles para la transfección de un transgén seleccionado en una célula seleccionada.

30 III. Vectores AAV

En una realización, los vectores AAV útiles en la invención contienen, como mínimo, secuencias que codifican un cápside de AAV en el que se encuentra empaquetado un casete de expresión heterólogo. El casete está flanqueado por ITR de AAV 5' y por ITR de AAV 3'. Las ITRs de AAV pueden proceder de la misma fuente que el cápside, o de una fuente diferente (*es decir*, un vector AAV seudotipado).

35

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de generación de un virus adeno-asociado (AAV) recombinante. Dicho procedimiento incluye cultivar una célula anfitrión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cápside de virus adeno-asociado (AAV), o un fragmento de la misma, según se define en la presente memoria; un casete de expresión flanqueado, como mínimo, por repeticiones de terminal invertido (ITRs) de AAV; y funciones auxiliares suficientes para permitir el empaquetamiento del casete de expresión en el cápside de AAV.

40

Los componentes requeridos para ser cultivados en la célula anfitrión para empaquetar un casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV en un cápside de AAV, pueden ser proporcionados a la célula anfitrión en trans. Alternativamente, uno cualquiera o más de los componentes requeridos (*por ejemplo*, casete de expresión, secuencias *rep*, secuencias *cap*, y/o funciones auxiliares) pueden ser proporcionados por una célula anfitrión estable que haya sido diseñada para contener uno o más de los componentes requeridos utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Más adecuadamente, dicha célula anfitrión estable podrá contener el (los) componente(s) requerido(s) bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el (los) componente(s) requerido(s) puede(n) estar bajo el control de un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados se proporcionan en la presente memoria, en la discusión de elementos reguladores adecuados para su uso con las secuencias que codifican el producto. En otra realización alternativa, una célula anfitrión estable seleccionada puede contener componente(s) seleccionado(s) bajo el control de un promotor constitutivo y otro(s) componente(s) seleccionado(s) bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, se puede generar una célula anfitrión estable que sea derivada de células 293 (que contenga funciones auxiliares de E1 bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contenga las proteínas *rep* y/o *cap* bajo el control de promotores inducibles. Incluso otras células anfitrión estables pueden ser generadas por parte de un experto en la materia.

45

50

55

60

El casete de expresión, las secuencias *rep*, las secuencias *cap*, y las funciones auxiliares que se requieren para la producción del rAAV, pueden ser suministradas a la célula anfitrión de empaquetamiento en forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias portadas por el mismo. El elemento genético seleccionado puede ser suministrado mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo los que se describen en la presente memoria. Los procedimientos utilizados para construir cualquier realización de la presente invención son conocidos

65

por los expertos en la manipulación de ácido nucleico, e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante, y técnicas sintéticas. Véase, *por ejemplo*, Sambrook et al., Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor, NY. De forma similar, los procedimientos de generación de viriones de rAAV son bien conocidos, y la selección de un procedimiento adecuado no es una limitación sobre la presente invención. Véase, *por ejemplo*, K. Fisher et al., J. Virol., 70: 520-532 1993) y la Patente US núm. 5.478.745.

A menos que se especifique otra cosa, las ITRs de AAV, los cápsides de AAV, y otros componentes de AAV seleccionados descritos en la presente memoria, pueden ser fácilmente seleccionados a partir de cualquier serotipo de AAV, incluyendo, sin limitación, el AAV 1 [Publicación de Patente Internacional núm. WO 00/28061], AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 y uno de los otros AAV descritos en la Publicación de Patente Internacional núm. WO 2003/042397. Estas ITRs u otros componentes de AAV pueden ser fácilmente aislados utilizando técnicas al alcance de los expertos en la materia a partir de un serotipo de AAV. Dicho AAV puede ser aislado u obtenido a partir de fuentes académicas, comerciales o públicas (*por ejemplo*, la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Alternativamente, se pueden obtener secuencias de AAV a través de medios sintéticos o de otros adecuados en referencia a secuencias publicadas, tales como las disponibles en la literatura o bases de datos tales como, *por ejemplo*, la base de datos GenBank™, la base de datos PubMed™, o similar.

Los vectores AAV útiles en la invención incluyen vectores en los que todas las secuencias de AAV y las proteínas de cápside (*por ejemplo*, fibra, pentón, hexón), se derivan de una única fuente. Alternativamente, todos los vectores AAV utilizados en la invención incluyen los que están trans-encapsidados (*es decir*, contienen un cápside de AAV de una fuente diferente que las ITRs de AAV y/o los otros elementos de AAV del cápside). Tales vectores trans-encapsidados incluyen los que están seudotipados con la utilización de técnicas convencionales, o que contienen cápsides sintéticos, artificiales y/o quiméricos. Véase, *por ejemplo*, la Publicación de Patente Internacional núm. WO 2003/042397, y la Patente US núm. 6.491.907].

En una realización, la invención utilizó vectores virales de AAV en los que una o más de las proteínas vp1, vp2 y/o vp3 (que se ensamblan para formar un cápside de AAV) se modifican con el fin de aumentar la antigenicidad del AAV, *por ejemplo*, incrementando la captación de vector mediante, y con la activación de, células de presentación de antígeno (APCs), células dendríticas, u otra célula objetivo o tipo de tejido. La proteína vp1, vp2 o vp3 modificada, se ensambla en un cápside de AAV que tiene el péptido insertado o la proteína expuesta sobre la superficie externa del cápside. Estas modificaciones pueden ser llevadas a cabo utilizando los procedimientos de Girod et al. [A. Girod, et al., Nat. Med., 5(9): 1052-1056 (1999)] o de Warrington et al., KH. Warrington, Jr., et al., J. Virol., 78(12): 6595-6609 (2004)]. De acuerdo con los métodos de Girod, un sitio en el dominio de codificación de un AAV seleccionado puede ser modificado insertando secuencias de ácido nucleico en la región de codificación correspondiente a la posición 587 de aminoácido del AAV2 [y en la secuencia correspondiente de otros AAVs, según se determine con el alineamiento utilizando programas y procedimientos convencionales]. Tal inserción de aminoácido puede ser de alrededor de 1 a 34 aminoácidos de longitud, y puede proporcionar el cápside de AAV ensamblado que contiene la proteína vp2 de AAV modificada con un péptido deseado, *por ejemplo*, un receptor específico de péptido, un antígeno u otra secuencia deseable. Ejemplos de fragmentos adecuados incluyen, *por ejemplo*, péptidos objetivados para células dendríticas, tales como el DC3, DC12 y DC18 descritos por T.J. Curiel, et al., J. Immunol. 172 (120): 7425-31 (2004).

De acuerdo con los procedimientos de Warrington, la terminación N del cápside de vp2 (*es decir*, la posición 138 de AAV2 y las posiciones correspondientes en otras secuencias de AAV), puede ser modificada para que contenga una inserción de un péptido, dando como resultado una proteína de fusión útil en el cápside de AAV ensamblado que contiene la proteína de cápside modificada. En una realización, estas proteínas de fusión confieren secuencias adicionales de elección de objetivos. En otras realizaciones, las proteínas de fusión pueden proporcionar secuencias antigénicas adicionales. En una realización, se seleccionan inserciones de hasta 250 aminoácidos, más deseablemente de 150 aminoácidos, o de longitudes de 5 a 150 aminoácidos. Ejemplos de fuentes de péptidos adecuadas incluyen fragmentos obtenidos a partir de, *por ejemplo*, flagelina, proteína de deterioro por calor, y proteínas de complemento (tal como componente de complemento 3, fragmento d).

Se comprenderá que se pueden seleccionar también otros vectores para su uso en la presente invención sin limitación en cuanto al origen del cápside y/o de la fuente de las ITRs de AAV o de otros elementos de AAV.

A. El Casete de Expresión de Empaquetamiento

Un casete de expresión heterólogo según se ha definido en lo que antecede en relación con los vectores adenovirales útiles en la invención, se localiza entre, por su extremo 5', repeticiones de terminal invertido (ITRs) 5' de AAV y, por su terminación 3', ITRs 3' de AAV. Otro AAV o elementos de vector, pueden estar localizados entre el casete de expresión y cualesquiera de las ITRs 5' de AAV o las ITRs 3' de AAV. Ésta es la construcción que se empaqueta en una proteína de cápside para proporcionar un vector AAV.

Los elementos del casete de expresión heteróloga, incluyendo las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto, los elementos de vector y similares, son seleccionados fácilmente a partir de los que se han descrito en lo que antecede para el vector adenoviral.

5 En una realización, el casete de expresión heteróloga suministrado a través del rAAV de acuerdo con la invención, contiene el producto inmunogénico enlazado operativamente a un promotor inducible o regulable. Cuando se utiliza en un régimen, el agente de inducción o de regulación se administra típicamente de tal modo que la expresión del producto se activa de forma inmediata a continuación de la administración del rAAV. Por lo tanto, la expresión puede ser extinguida mediante la retirada del agente de inducción o de regulación. El régimen de la invención puede incluir
10 activación de expresión de "pulso". En otras palabras, la expresión puede ser inducida, extinguida, y después inducida de nuevo tras un período de tiempo.

Los promotores inducibles y regulables permiten la regulación de expresión de gen y pueden ser regulados mediante compuestos suministrados exógenamente, factores medioambientales tales como la temperatura, o con la presencia de un estado fisiológico específico, *por ejemplo*, mediante fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o replicación. Los promotores y sistemas regulables están disponibles a partir de una diversidad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito otros muchos sistemas y pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, los promotores inducibles incluyen el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc y el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex). Otros sistemas inducibles incluyen el sistema promotor de polimerasa [documento WO 98/10088]; el promotor de insecto de ecdisoma [No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)], y el sistema inducible por tetraciclina [Gossen et al., Science, 268: 1766-1769 (1995), véase también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518 (1998)]. Otros sistemas incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 que utiliza castradiol, difenol murislerona, el sistema inducible RU486 [Wang et al., Nat. Biotech., 15: 239-243 (1997), y Wang et al., Gene Ther., 4: 432-441 (1997) y el sistema inducible por rapamicina [Magari et al., J. Clin. Invest., 100: 2865-2872 (1997)]. La efectividad de algunos promotores inducibles se incrementa con el tiempo. En tales casos, se puede aumentar la efectividad de tales sistemas insertando múltiples represores en tándem, *por ejemplo*, TetR enlazado a un TetR mediante un IRES. Alternativamente, se puede esperar al menos 3 días antes de apantallar la función deseada. Se puede aumentar la expresión de proteínas deseadas a través de medios conocidos, para aumentar la efectividad de este sistema. Por ejemplo, utilizando el Elemento Regulatorio Post-transcripcional del Virus de Hepatitis de Woodchuck (WPRE). La selección del promotor regulable no es una limitación de la presente invención.

Además, el procedimiento divulgado no se limita al uso de tales promotores, y los casetes de expresión heteróloga portados por el rAAV de acuerdo con el procedimiento divulgado pueden incluir promotor constitutivo, natural o específico del tejido. La selección de este promotor no es una limitación sobre la presente invención.

B. Secuencias *Rep* y *Cap*

40 Además del minigén, la célula anfitrión contiene las secuencias que impulsan expresión de una proteína de cápside de AAV (o una proteína de cápside que comprende un fragmento del mismo) en la célula anfitrión, y secuencias *rep* del mismo serotipo que el serotipo de las ITRs de AAV encontradas en el minigén, o de un serotipo de complementación cruzada. Las secuencias *cap* y *rep* de AAV pueden ser obtenidas independientemente de la fuente de AAV según se ha descrito en lo que antecede, y pueden ser introducidas en la célula anfitrión de cualquier
45 manera conocida en el estado de la técnica según se ha descrito con anterioridad. Adicionalmente, cuando se realiza el seudotipado de un vector de AAV (*por ejemplo*, un AAV9/HU de 14 cápsides), las secuencias que codifican cada una de las proteínas *rep* esenciales pueden ser sustituidas por serotipos AAV diferentes (*por ejemplo*, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, o cualquiera de los serotipos identificados en la presente memoria). Por ejemplo, las secuencias *rep78/68* pueden ser de AAV2, mientras que las secuencias *rep52/40*
50 pueden ser de AAV8.

En una realización, la célula anfitrión contiene establemente la proteína de cápside bajo el control de un promotor adecuado, tal como los que se han descrito en lo que antecede. En una realización, la proteína de cápside se expresa bajo el control de un promotor inducible. En otra realización, la proteína de cápside se suministra a la célula anfitrión en *trans*. Cuando se suministra a la célula anfitrión en *trans*, la proteína de cápside puede ser suministrada mediante un plásmido que contenga las secuencias necesarias para dirigir la expresión de la proteína de cápside seleccionada en la célula anfitrión. Cuando se suministra a la célula anfitrión en *trans*, el plásmido portador de la proteína de cápside puede portar también otras secuencias requeridas para empaquetar el rAAV, *por ejemplo*, las secuencias *rep*.
55

En otra realización, la célula anfitrión contiene establemente las secuencias *rep* bajo el control de un promotor adecuado, tal como los que se han descrito en lo que antecede. De manera más deseable, en esta realización, las proteínas *rep* esenciales son expresadas bajo el control de un promotor inducible. En otra realización, las proteínas *rep* son suministradas a la célula anfitrión en *trans*. Cuando se suministran a la célula anfitrión en *trans*, las proteínas *rep* pueden ser suministradas por medio de un plásmido que contenga las secuencias necesarias para dirigir la
60
65

expresión de las proteínas *rep* seleccionadas en la célula anfitrión. De manera más deseable, cuando se suministra a la célula anfitrión en *trans*, el plásmido portador de la proteína de cápside porta también otras secuencias requeridas para empaquetar el rAAV, *por ejemplo*, las secuencias *rep* y *cap*.

5 De ese modo, en una realización, las secuencias *rep* y *cap* pueden ser transfectadas en la célula anfitrión sobre una única molécula de ácido nucleico y existir establemente en la célula como un episoma. En otra realización, las secuencias *rep* y *cap* están integradas establemente en el cromosoma de la célula. Otra realización tiene las secuencias *rep* y *cap* expresadas transitoriamente en la célula anfitrión. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico útil para tal transfección comprende, desde 5' a 3', un promotor, un separador opcional intercalado entre el promotor
10 y el sitio de inicio de la secuencia de gen *rep*, una secuencia de gen *rep* de AAV, y una secuencia de gen *cap* de AAV.

Opcionalmente, las secuencias *rep* y/o *cap* pueden ser suministradas sobre un vector que contenga otras secuencias de ADN que han de ser introducidas en las células anfitrión. Por ejemplo, el vector puede contener la construcción de rAAV que comprenda el minigén. El vector puede comprender uno o más de los genes que codifican las funciones auxiliares, *por ejemplo*, las proteínas adenovirales E1, E2a, y E4ORF6, y el gen para VAI ARN.

El promotor utilizado en esta construcción puede ser cualquiera de los promotores constitutivo, inducible o natural conocidos por los expertos en la materia, o como se ha discutido en lo que antecede. En una realización, se emplea una secuencia de promotor P5 de AAV. La selección del AAV para proporcionar cualquiera de estas secuencias no limita la invención.

En otra realización, el promotor para *rep* es un promotor inducible, tal como los que se han discutido en lo que antecede en relación con los elementos regulatorios de transgén. Un promotor preferido para expresión *rep* es el promotor T7. El vector que comprende el gen *rep* regulado por el promotor T7 y el gen *cap*, es transfectado o transformado en una célula que expresa ya sea constitutivamente o ya sea induciblemente la polimerasa de T7. Véase la Publicación de Patente Internacional núm. WO 98/10088, publicada el 12 de Marzo de 1998.

El separador es un elemento opcional en el diseño del vector. El separador es una secuencia de ADN intercalada entre el promotor y el sitio de inicio ATG de gen *rep*. El separador puede tener cualquier diseño deseado; es decir, puede ser una secuencia aleatoria de nucleótidos o, alternativamente, puede codificar un producto de gen tal como un gen marcador. El separador puede contener genes que incorporen típicamente sitios de inicio/ terminación y poliA. El separador puede ser una secuencia de ADN no codificante, procedente de una procarionota o una eucariota, una secuencia repetitiva no codificante, una secuencia codificante sin controles transcripcionales, o una secuencia codificante con controles transcripcionales. Dos ejemplos de fuentes de secuencias separadoras son las secuencias en escalera λ fago, o secuencias en escalera de levadura, que están disponibles comercialmente, *por ejemplo*, en Gibco o Invitrogen, entre otros. El separador puede ser de un tamaño cualquiera suficiente para reducir la expresión de los productos de gen *rep78* y *rep68*, que dejan los productos de gen *rep52*, *rep40* y *cap* expresados a niveles normales. La longitud del separador puede estar por lo tanto comprendida en la gama de alrededor de 10 bp a alrededor de 10,0 kbp, con preferencia en la gama de alrededor de 100 bp a alrededor de 8,0 kbp. Para reducir la posibilidad de recombinación, el separador es con preferencia de una longitud menor de 2 kbp; sin embargo, la invención no está limitada en ese sentido.

Aunque la(s) molécula(s) que proporciona(n) *rep* y *cap* puede(n) existir en la célula anfitrión de forma transitoria (es decir, mediante transfección), se prefiere que una o ambas de las proteínas *rep* y *cap* y el (los) promotor(es) que controla(n) su expresión, estén expresados de forma estable en la célula anfitrión, *por ejemplo*, como un episoma o mediante integración en el cromosoma de la célula anfitrión. Los procedimientos empleados para construir las realizaciones de la presente invención, son las técnicas convencionales de ingeniería genética o de ingeniería recombinante, tales como las descritas en las referencias anteriores. Mientras esta descripción proporciona ejemplos ilustrativos de construcciones específicas, con la utilización de la información proporcionada en la presente memoria un experto en la materia puede seleccionar y diseñar otras construcciones adecuadas, utilizando una opción de separadores, promotores P5, y otros elementos, incluyendo al menos una señal de traducción de inicio y terminación, y la adición opcional de sitios de poliadenilación.

55 En otra realización de la presente invención, la proteína *rep* o *cap* puede ser proporcionada establemente por una célula anfitrión.

C. Las Funciones Auxiliares

60 La célula anfitrión de empaquetamiento requiere también funciones auxiliares con el fin de empaquetar el rAAV. Opcionalmente, estas funciones son proporcionadas por un herpesvirus. Las funciones auxiliares necesarias pueden ser proporcionadas, cada una de ellas, a partir de una fuente de adenovirus de primate humano o no humano, tal como las que se han descrito en lo que antecede y/o están disponibles a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA (US). Todavía en otra realización, la célula anfitrión se dota de, y/o contiene, un producto de gen E1a, un producto de gen E1b, un producto de gen E2a, y/o un

producto de gen E4 ORF6. La célula anfitrión puede contener otros genes adenovirales tal como el VA1 ARN, pero estos genes no son necesarios. Todavía en otra realización, no están presentes en la célula anfitrión otros genes adenovirales o funciones de gen.

5 Mediante "ADN adenoviral que expresa el producto de gen E1a", se indica cualquier secuencia de adenovirus que codifique E1a o cualquier porción funcional de E1a. El ADN adenoviral que expresa el producto de gen E2a y el ADN adenoviral que expresa los productos de gen E4 ORF6, se definen de manera similar. También están incluidos los alelos u otras modificaciones del gen adenoviral o de la porción funcional del mismo. Tales modificaciones pueden ser introducidas deliberadamente recurriendo a técnicas convencionales de ingeniería genética o mutagénicas para
10 aumentar la función adenoviral de alguna manera, así como también a variantes alélicas de las mismas que se producen de forma natural. Tales modificaciones y procedimientos de manipulación de ADN para conseguir estas funciones de gen de adenovirus, son conocidos por los expertos en la materia.

15 Los productos de gen E1a, E1b, E2a y E4ORF6 de adenovirus, así como también cualesquiera otras funciones auxiliares deseadas, pueden ser proporcionados con la utilización de cualquier medio que permita su expresión en una célula. Cada una de las secuencias que codifican estos productos puede estar en un vector separado, o uno o más genes pueden estar en el mismo vector. El vector puede ser cualquier vector conocido en el estado de la técnica o de los divulgados en lo que antecede, incluyendo los plásmidos, cósmidos y virus. La introducción del vector en la célula anfitrión puede ser lograda con cualquier medio conocido en el estado de la técnica o mediante
20 los divulgados en lo que antecede, incluyendo transfección, infección, electroporación, suministro de liposoma, técnicas de fusión de membrana, bolitas recubiertas de ADN de alta velocidad, infección viral y fusión de protoplasto, entre otros. Uno o más de los genes adenovirales puede estar integrado de forma estable en el genoma de la célula anfitrión, expresado establemente como episomas, o expresado transitoriamente. Los productos de gen pueden ser todos expresados transitoriamente sobre un episoma, o estar integrados de forma estable, o algunos de los
25 productos de gen pueden ser expresados establemente mientras que otros son expresados transitoriamente. Además, los promotores para cada uno de los genes adenovirales pueden ser seleccionados independientemente a partir de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenoviral natural. Los promotores pueden estar regulados mediante un estado fisiológico específico del organismo o de la célula (*es decir*, por el estado de diferenciación o en células replicantes o quiescentes) o mediante factores exógenamente añadidos, por ejemplo.

30 **D. Células Anfitrión y Líneas de Células de Empaquetamiento**

La propia célula anfitrión puede ser seleccionada a partir de cualquier organismo biológico, incluyendo las células procarióticas (*por ejemplo*, las bacterianas), y las células eucarióticas, incluyendo células de insectos, células de levadura y células de mamíferos. En una realización, las células anfitrión se seleccionan entre especies de mamíferos cualesquiera, sin limitación, células tales como A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, células 293 (que expresan el E1 adenoviral funcional), Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblasto primario, células de hepatocito y mioblasto extraídas de mamíferos
40 incluyendo los humanos, el mono, el ratón, la rata, el conejo y el hámster. La selección de las especies de mamíferos que proporcionan las células no es una limitación de la presente invención; ni lo es tampoco el tipo de célula de mamífero, *es decir*, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral, etc. Los requisitos para la célula utilizada consisten en que la misma no porte ningún gen de adenovirus distinto de E1, E2a y/o E4 ORF6; no contenga ningún otro gen de virus que pudiera dar como resultado una recombinación homóloga de un virus contaminante durante la producción de rAAV; y que sea capaz de infección o transfección de ADN y expresión del ADN transfectado. En una
45 realización, la célula anfitrión es una que tiene *rep* y *cap* transfectadas establemente en la célula.

Una célula anfitrión útil en la presente invención es una célula transformada establemente con las secuencias que codifican *rep* y *cap*, y que está transfectada con el ADN de adenovirus E1, E2a y E4ORF, y una construcción portadora del minigén según se ha descrito en lo que antecede. Líneas de células que expresan *rep* y *cap* de forma estable, tales como B-50 (PCT/ US 98/19463), o las descritas en la Patente U.S. núm. 5.658.785, pueden ser empleadas de forma similar. Otra célula anfitrión contiene el ADN adenoviral mínimo que es suficiente para expresar E4 ORF6. Incluso otras líneas de células pueden ser construidas utilizando las novedosas secuencias *cap* AAV9.

55 La preparación de una célula anfitrión incluye técnicas tales como ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede ser realizado con la utilización de técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen la clonación de cADN y genómica, las cuales son bien conocidas y las cuales han sido descritas por Sambrook et al., mencionado anteriormente, el uso de secuencias solapantes de nucleótidos del adenovirus y genomas AAV combinadas con reacción de cadena de polimerasa, métodos sintéticos, y cualesquiera otros procedimientos adecuados que proporcionen la secuencia de nucleótido deseada.

60 La introducción de las moléculas (como plásmidos o virus) en la célula anfitrión, puede ser realizada también con la utilización de técnicas conocidas por el experto en la materia, y según se ha discutido a través de la descripción. En la realización preferida, se utilizan técnicas de transfección estándar, *por ejemplo*, transfección de CaPO₄ o electroporación, y/o infección mediante vectores híbridos de adenovirus/ AAV en líneas celulares tales como la línea

de células HEK 293 de riñón embrionario humano (una línea de células de riñón humano que contiene genes E1 de adenovirus funcional que proporcionan proteínas E1 de actuación trans).

- 5 De ese modo, la invención se refiere además a vectores útiles en los regímenes de vacuna/ inmunización descritos en la presente memoria. Estas, u otras construcciones de vector, pueden ser utilizadas en regímenes para el suministro de un inmunógeno en un régimen que incluya la administración secuencial de vectores Ad.

IV. Regímenes de Inmunización

- 10 Se utilizan vectores recombinantes en el régimen de inmunización de la invención para inducir una respuesta inmune en un paciente humano o veterinario no simio a continuación de la administración *ex vivo* o *in vivo*. En una realización, la respuesta inmune inducida es una respuesta humoral (es decir, anticuerpo) al producto expresada por los vectores virales. Dependiendo del producto antígeno expresado, tal respuesta de anticuerpo puede ser específica al patógeno del que se deriva el antígeno o de reacción cruzada con otros patógenos relacionados. En
15 otra realización, la respuesta inmune puede ser una respuesta celular (*por ejemplo*, CTL). Dependiendo del producto inmunogénico expresado, tal respuesta CTL puede ser específica del patógeno del que se deriva el inmunógeno o de reacción cruzada con otros patógenos relacionados. Todavía en otra realización, ambas respuestas de patógeno y CTL pueden ser inducidas. Sin embargo, el procedimiento de la invención resulta ventajoso puesto que minimiza, y en algunos casos elimina, la respuesta inmune al vector viral y, en particular, al vector adenoviral.

- 20 Así, los regímenes de inmunización pueden ser aplicados tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Tales composiciones de vacuna (u otras inmunogénicas) están formuladas en un vehículo de suministro adecuado, según se ha descrito en lo que antecede. En general, las dosis para las composiciones inmunogénicas están comprendidas en la gama definida anteriormente para las composiciones terapéuticas. Los niveles de inmunidad del gen
25 seleccionado pueden estar comprendidos en la gama definida anteriormente para las composiciones terapéuticas. Los niveles de inmunidad del gen seleccionado pueden ser monitorizados para determinar la necesidad, si existe, de potenciadores. Después de una evaluación de títulos de anticuerpo en el suero, pueden ser deseables inmunizaciones potenciadoras opcionales.

- 30 Opcionalmente, se puede formular una composición que contenga vectores virales según se ha descrito en la presente memoria, así como también otros componentes, incluyendo, *por ejemplo*, adyuvantes, estabilizadores, ajustadores de pH, conservantes y similares. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol y paraclorofenol.

- 35 Estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, complejos de estimulación inmune (ISCOMS), LPS análogos que incluyen lípido A de monofosforil 3-O-desacilado (Ribi Immunochem Research Inc.; Hamilton, MT), aceite mineral y agua, hidróxido de aluminio, Amphigen, Avirdine, L 121/ escualeno, péptidos de muramilo, y saponinas, tal como Quil A, y cualquier factor biológicamente activo, tal como citoquinas, una interleuquina, una chemoquina, un ligando, y opcionalmente
40 combinaciones de los mismos. Algunos de estos factores biológicamente activos pueden ser expresados *in vivo*, *por ejemplo*, a través de un plásmido o de un vector viral. Por ejemplo, se puede administrar un adyuvante de ese tipo con un vector adenoviral de imprimación.

- 45 Los vectores virales utilizados en la invención son administrados en “una cantidad inmunogénica”, es decir, una cantidad de virus que es efectiva en una vía de administración para transfectar las células deseadas y proporcionar niveles de expresión suficientes del gen seleccionado para inducir una respuesta inmune. Cuando se proporciona inmunidad protectora, se considera que los virus que constituyen las composiciones de vacuna son útiles para impedir la infección y/o enfermedad recurrente.

- 50 Alternativamente, o adicionalmente, los vectores utilizados en la invención pueden contener secuencias de ácido nucleico que codifiquen un producto (*por ejemplo*, un péptido, polipéptido o proteína) que induzca una respuesta inmune a un inmunógeno seleccionado. Se espera que el régimen inmunogénico proporcionado en la presente memoria sea altamente eficaz en la inducción de células T citolíticas y de anticuerpos respecto a la proteína antigénica heteróloga insertada expresada por el vector.

- 55 Los inmunógenos pueden ser seleccionados a partir de una diversidad de familias virales. Ejemplos de familias virales frente a las que puede ser deseable una respuesta inmune incluyen la familia de picovirus, los cuales incluyen los géneros rinovirus, que son responsables de aproximadamente el 50% de los casos de resfriado común; los géneros enterovirus, que incluyen los poliovirus, coxsackievirus, ecovirus, y enterovirus humanos tales como el
60 virus de la hepatitis A; los géneros aptovirus, que son responsables de enfermedades de los pies y la boca, principalmente en animales no humanos. Dentro de la familia de virus de los picomavirus, los antígenos objetivo incluyen el VP1, VP2, VP3, VP4 y VPG. Otra familia de virus incluye la familia calcivirus, que abarca el grupo de virus Norwalk, que son un importante agente causante de gastroenteritis epidémica. Todavía otra familia viral deseable para su uso en antígenos objetivo para inducir respuestas inmunes en humanos y animales no humanos,
65 es la familia togavirus, que incluye los géneros alfavirus, los cuales incluyen virus Sindis, virus RossRiver, y

encefalitis Venezuelan, Easter & Western Equine, y rubivirus, incluyendo el virus Rubeola. La familia flaviviridae incluye el virus del dengue, de la fiebre amarilla, de la encefalitis Japonesa, de la encefalitis de St. Louis, y de la encefalitis transmitidos por garrapatas.

5 Otros antígenos objetivo pueden ser generados a partir de la Hepatitis C [véase, *por ejemplo*, la Solicitud de Patente US Publicada núm. US 2003/190606 (9 de Octubre de 2003); el documento US 2002/081568 (27 de Junio de 2002), o la familia de coronavirus, la cual incluye un número de virus no humanos tales como el virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral), el virus gastroentérico transmisible porcino (cerdos), el virus de encefalomielitis hemaglutinante porcino (cerdos), el virus de la peritonitis infecciosa felina (gatos), el coronavirus entérico felino
10 (gatos), el coronavirus canino (perro), y los coronavirus respiratorios humanos, que pueden causar el resfriado común y/o la hepatitis no-A, B o C. Dentro de la familia de coronavirus, los antígenos objetivo incluyen el E1 (también llamado M o proteína matriz), el E2 (también llamado S o proteína de Spike), el E3 (también llamado HE o hemaglutina-elterosa), la glicoproteína (no presente en todos los coronavirus), o el N (nucleocápside). La familia de coronavirus incluye el agente causante putativo para el síndrome respiratorio repentino agudo (SARS). Todavía otros antígenos pueden ser objetivos frente a la familia de rbdovirus, la cual incluye los géneros vesiculovirus
15 (*por ejemplo*, el Virus Stomatitis Vesicular), y el lisavirus general (*por ejemplo*, las rabias). Dentro de la familia rbdovirus, los antígenos adecuados pueden ser extraídos de la proteína G o de la proteína N. La familia filoviridae, la cual incluye los virus de la fiebre hemorrágica tales como el virus Maburg y el Ébola, pueden ser una fuente adecuada de antígenos. La familia paramixovirus incluye el Virus Tipo 1 de la parainfluenza, el Virus Tipo 3 de la parainfluenza, el Virus Tipo 3 de la parainfluenza bovina, el rubulavirus (virus de las paperas), el Virus Tipo 2 de la parainfluenza, el Virus Tipo 4 de la parainfluenza, el virus de la enfermedad de Newcastle (pollos), la ictericia hematórica, el morbilivirus, el cual incluye el sarampión y el moquillo canino, y el neumovirus, el cual incluye el virus sincitial respiratorio (*por ejemplo*, la proteína glico- (G) y la proteína de fusión (F), para las que se encuentran disponibles secuencias en GenBank).

25 El virus de la gripe está clasificado dentro de la familia de ortomixovirus, y es una fuente adecuada de antígeno (*por ejemplo*, la proteína HA, la proteína N1). La familia bunyavirus incluye los géneros bunyavirus (cefalitis California, La Cross), flebovirus (Fiebre del Valle del Rift), hantavirus (el puremala es un virus de la fiebre de hemahagin), nairovirus (enfermedad de la oveja de Noirobi), y diversos bungavirus sin asignar. La familia de arenavirus proporciona una fuente de antígenos frente al virus LCM y de la fiebre de Lassa. La familia de los reovirus incluye los géneros reovirus, rotavirus (el cual provoca gastroenteritis agua en los niños), orbivirus, y cultivirus (fiebre de las Montañas de Colorado, Lebombo (humanos), encefalosis equina, lengua azul).

35 La familia de retrovirus incluye la sub-familia oncovirinal que abarca enfermedades humanas y veterinarias tales como el virus de leucemia felina, HTLVI y HTLVII, lentivirinal (que incluye el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la anemia infecciosa equina, y espumavirinal). Entre los lentivirus, se han descrito muchos antígenos adecuados que pueden ser fácilmente seleccionados. Ejemplos de antígenos de VIH y VIS adecuados incluyen, sin limitación, las proteínas gag, pol, Vif, Vpx, VPR, Env, Tat, Nef y Rev, así como también varios fragmentos de las mismas. Por ejemplo,
40 fragmentos adecuados de la proteína Env pueden incluir cualquiera de sus sub-unidades tales como la gp 120, la gp 160, la gp 140, la gp 141, o fragmentos más pequeños de las mismas, *por ejemplo*, de al menos alrededor de 8 aminoácidos de longitud. De forma similar, se pueden seleccionar los fragmentos de la proteína tat. [Véase la Patente US núm. 5.891.994 y la Patente US núm. 6.193.981]. Véase, también, las proteínas VIH y VIS descritas en D.H. Barouch et al., J. Virol., 75(5): 2462-2467 (Marzo de 2001), y R.R. Amara, et al., Science, 292: 69-74 (6 de Abril de 2001). En otro ejemplo, las proteínas inmunogénicas o los péptidos del VIH y/o del VIS, pueden ser utilizados para formar proteínas de fusión u otras moléculas inmunogénicas. Véase, por ejemplo, las proteínas de fusión Tat y/o Nef del VIH-1 y los regímenes de inmunización descritos en el documento WO 01/54719 publicado el 2 de Agosto de 2001, y el documento WO 99/16884, publicado el 8 de Abril de 1999. La divulgación no está limitada a las proteínas inmunogénicas de VIH y VIS o a los péptidos que se describen en la presente memoria. Adicionalmente,
50 una diversidad de modificaciones a estas proteínas han sido descritas o podrían ser fácilmente realizadas por un experto en la materia. Véase, *por ejemplo* la proteína gag modificada que se describe en la Patente US núm. 5.972.596. Además, cualquier inmunógeno deseado de VIH o de VIS, puede ser suministrado solo o en combinación. Tales combinaciones pueden incluir expresión a partir de un único vector o de múltiples vectores. Opcionalmente, otra combinación puede incluir el suministro de uno o más inmunógenos expresados que suministren uno o más de los inmunógenos en forma de proteína. Fuentes adicionales de antígenos e inmunógenos objetivo se discuten con mayor detalle en lo que sigue.

60 La familia de papovavirus incluye la sub-familia de polioma virus (virus BKU y JCU) y la sub-familia de papilomavirus (asociados a cánceres o a la progresión maligna de papilomas). Ejemplos proteínas de papilomavirus útiles como productos inmunogénicos incluyen los derivados de los genes "pronto" y "tardío" del virus del papiloma designados como E1 a E7, L1 y L2. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente US Publicada núm. 2002/0137720 [Ertl]. Se han descrito otros antígenos de papilomavirus y combinaciones de los mismos. Véase, *por ejemplo*, la Solicitud de Patente US Publicada núm. 2003/129199 (10 de Julio de 2003); la Solicitud de Patente US Publicada núm. 2002/18221 (15 de Diciembre de 2002); la Patente US núm. 6.342.224.

65

La familia de adenovirus incluye virus (EX, AD7, ARD, O.B.) que causan enfermedad respiratoria y/o enteritis. La familia papirovirus incluye el papirovirus felino (enteritis felina), el panleucopeniavirus felino, el parvovirus canino, y el parvovirus porcino. La familia herpesvirus incluye la sub-familia alphaherpesvirinae, la cual abarca los géneros simplexvirus (HSV1, HSVII), varicelovirus (pseudo-rabias, varicela zoster) y la sub-familia betaherpesvirinae, la cual incluye los géneros citomegalovirus (CMV Humano), muromegalovirus) y la sub-familia gammaherpesvirinae, la cual incluye los géneros linfocriptovirus, EBV (linfoma de Burkitts), rinotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, y radinovirus. La familia poxvirus incluye la sub-familia cordopoxvirinae, la cual abarca los géneros ortopoxvirus (Viruela (Smallpox) y Vaccinia (Cowpox)), parapoxvirus, avipoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, y la sub-familia entomopoxvirinae. La familia hepadnavirus incluye el virus de la Hepatitis B. Un virus sin clasificar que puede ser una fuente adecuada de antígenos, es el virus delta de la Hepatitis. Incluso otras fuentes virales pueden incluir el virus de la enfermedad bursal infecciosa aviar y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. La familia alfavirus incluye el virus de la arteritis equina y varios virus de Encefalitis.

La presente invención puede referirse también a regímenes que utilizan productos que son útiles para inmunizar un humano o un animal no humano contra otros patógenos incluyendo las bacterias, los hongos, microorganismos parásitos o parásitos multicelulares que infectan a los vertebrados humanos y a los no humanos, o de una célula cancerígena o una célula tumoral. Ejemplos de patógenos bacterianos incluyen los cocos patógenos gram-positivos que incluyen los neumococos, estafilococos, y estreptococos. Los cocos patogénicos gram-negativos incluyen los meningococos, y los gonococos. Los bacilos entéricos patogénicos gram-negativos incluyen los enterobacteriaceos, las seudomonas, acinobacterias y la eikenella; melioidosis; salmonella; shigella; hemófilos (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*); moraxella; *H. durceyi* (que causa cancroide); brucella; *Francisella tularensis* (que causa la tularemia); yersinia (pasteurella); estreptobacilo moniliformis y spirillum. Los bacilos gram-positivos incluyen monocitógenos de listeria; erisipelothrix rhusiopathiae; *Corynebacterium diphtheria* (difteria); cólera; *B. anthracis* (ántrax); donovanosis (granuloma inguinal), y bartonellosis. Las enfermedades causadas por bacterias anaerobias patogénicas incluyen el tétanos; botulismo; otra clostridia; tuberculosis; lepra; y otras microbacterias.

Ejemplos de especies de bacterias específicas son, sin limitación, las *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pilori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Samonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdoferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma gallisepticum*.

Las enfermedades patogénicas espiroquetales incluyen la sífilis; guiños, pinta y sífilis endémica; y leptospirosis. Otras infecciones causadas por bacterias patógenas más altas y hongos patogénicos, incluyen la actinomicosis; nocardiosis; criptococosis (*Cryptococcus*), blastomicosis (*Blastomyces*), histoplasmosis (*Histoplasma*) y cocoyodomicosis (*Coccidiodes*); candidiasis (*Candida*), aspergillosis (*Aspergillus*), y mucomicosis; esporotricosis; paracocodiyodomicosis, petrieliidiosis, torulopsosis, micetoma y cromomicosis; y dermatofitosis. Las infecciones de Rickettsial incluyen la fiebre del tífus, la fiebre de las Montañas Rocosas, la fiebre Q, y la Rickettsialpox. Ejemplos de infecciones clamidiales y de micoplasma incluyen: infecciones por micoplasma pneumoniae; lymphogranuloma venereum; psitacosis; e infecciones clamidiales perinatales. Las eucariotas patogénicas abarcan los protozoos patogénicos y las infecciones producidas por las mismas incluyen: amebiasis; malaria; leishmaniasis (por ejemplo, causa por *Leishmania major*); tripanosomiasis; toxoplasmosis (por ejemplo, causada por *Toxoplasma gondii*); *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; babesiosis; giardiasis (por ejemplo, causada por *Giardia*); triquinosis (por ejemplo, causada por *Trichomonas*); filariasis; esquistosomiasis (por ejemplo, causada por *Schistosoma*); nematodos; trematodos o gusanos; y cestodos (tapeworm). Otras infecciones parásitas pueden estar causadas por *Ascaris*, *Trichuris*, *Cryptosporidium* y *Pneumocystis carinii*, entre otros.

Muchos de estos organismos y/o toxinas producidas por los mismos, han sido identificados por los Centros para el Control de Enfermedades [(CDC), Departamento de Salud y Servicios Humanos, USA], como agentes que tienen un potencial para su uso en ataques biológicos. Por ejemplo, algunos de estos agentes biológicos incluyen *Bacillus anthracis* (ántrax), *Clostridium botulinum* y su toxina (botulismo), *Yersinia pestis* (plaga), viruela mayor (smallpox), *Francisella tularensis* (tularemia), y fiebres hemorrágicas virales [filovirus (por ejemplo, Ébola, Marburg)], todos los cuales están actualmente clasificados como agentes de Categoría A; *Coxiella burnetti* (fiebre Q); especies de Brucella (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis), *Ricinus communis* y sus toxinas (toxina de ricina), *Clostridium perfringens* y su toxina (toxina épsilon), especies de *Staphylococcus* y sus toxinas (enterotoxina B), *Chlamydia psittaci* (psitacosis), amenazas a la seguridad del agua (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*), fiebre del Tífus (*Rickettsiapowazekii*), y encefalitis vírica (alfavirus, por ejemplo, encefalitis equina Venezolana; encefalitis equina Eastern; encefalitis equina western); todos los cuales están actualmente clasificados como agentes de Categoría C. Adicionalmente, otros organismos que están clasificados de la misma manera o de manea diferente, pueden ser identificados y/o utilizados para este propósito en el futuro. Se comprenderá fácilmente que los vectores virales y otras construcciones que se han descrito en la presente memoria, son útiles para suministrar antígenos a partir de estos organismos, virus, sus toxinas u otros subproductos, que podrán evitar y/o tratar la infección u otras reacciones adversas con estos agentes biológicos.

La administración de los vectores para suministrar inmunógenos contra la región variable de las células T, genera una respuesta inmune que incluye CTLs para eliminar esas células T. En artritis reumatoide (RA), han sido caracterizadas varias regiones variables específicas de receptores de células T (TCRs) que están involucradas en la enfermedad. Estas TCRs incluyen las V-3, V-14, V-17 y V α -17. De ese modo, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos uno de esos polipéptidos, generará una respuesta inmune que tendrá como objetivo células T involucradas en RA. En esclerosis múltiples (MS), varias regiones variables específicas de TCRs que están involucradas en la enfermedad, han sido caracterizadas. Estas TCRs incluyen la V-7 y la V α -10. De ese modo, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos uno de esos polipéptidos, generará una respuesta inmune que tendrá como objetivo células T involucradas en MS. En la escleroderma, varias regiones variables específicas de TCRs que están involucradas en la enfermedad, han sido caracterizadas. Estas TCRs incluyen la V-6, V-8, V-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. De ese modo, el suministro de un adenovirus de simio recombinante que codifique al menos uno de esos polipéptidos, generará una respuesta inmune que tendrá como objetivo células T involucradas en la escleroderma.

Además, los inmunógenos deseables incluyen los dirigidos a producir un efecto terapéutico o profiláctico anti-cáncer en un anfitrión vertebrado, tal como, sin limitación, los que utilizan un antígeno de cáncer o un antígeno asociado a un tumor incluyendo, sin limitación, el antígeno específico de próstata, el antígeno carcino-embriónico, el UC-1, el He2, el CA-125 y el MAGE-3.

De manera adecuada, los vectores adenovirales y los vectores de AAV se suministran en un régimen de combinación que incluye la administración secuencial, o la coadministración, de un vector adenoviral y un vector de AAV. Estos regímenes pueden incluir además la administración secuencial o la coadministración con uno o más vectores de adenovirus adicionales, *por ejemplo*, un adenovirus funcionalmente borrado en E1, un adenovirus funcionalmente borrado en E4, uno o más vectores de AAV adicionales, u otros agentes terapéuticos y/o de vacuna.

En una realización, el régimen incluye además la administración de vacuna de ADN, *por ejemplo*, a través de un cañón de gen o un plásmido. Una vacuna de ADN de ese tipo puede ser utilizada como etapa de imprimación, que precede a un suministro mediado adenoviral y/o mediado de AAV. Alternativamente, tal vacuna de ADN puede ser utilizada como un potenciador a continuación de uno o más suministros mediados adenovirales y/o mediados de AAV.

En otra realización, el régimen incluye además una administración secuencial o coadministración de una vacuna a base de proteína. Tal vacuna puede ser utilizada como un potenciador, a continuación de un suministro mediado adenoviral y/o mediado de AAV. Alternativamente, tal vacuna a base de proteína puede ser utilizado como una imprimación, o entre una o más inmunizaciones mediadas adenovirales y/o mediadas de AAV en un régimen.

En un ejemplo, un régimen de inmunización de la invención proporciona una respuesta inmune protectora respecto al virus, la bacteria u otro organismo, del que se ha extraído el antígeno, o un virus de reacción cruzada, una bacteria u otra fuente. En otro ejemplo, el régimen de inmunización descrito en la presente memoria puede incluir un régimen multi-proteína. Véase, *por ejemplo*, R.R. Amara, Science, 292: 69-74 (6 de Abril de 2001), que describe un régimen de multi-proteína para expresión de sub-unidades de proteína útiles para generar una respuesta inmune contra el VIH y el VIS.

En otra realización deseada, el régimen proporciona un efecto terapéutico inmune. Opcionalmente, estos efectos pueden ser medidos utilizando ensayos para la detección de la presencia de anticuerpos específicos del antígeno, células T, o la condición para la que se está administrando la terapia.

Los vectores usados en un régimen de inmunización pueden ser administrados en varios sitios del cuerpo en una dosis dependiente de la manera, lo que depende del producto en el que esté objetivada la respuesta inmune deseada. La invención no se limita a la cantidad o al sitio de la(s) inyección(es) lo al portador farmacéutico. Por el contrario, el régimen puede incluir una etapa de imprimación o de potenciamiento, cada una de las cuales puede incluir una única dosis o una dosificación que sea administrada por horas, por días, por semanas o meses, o por años. La cantidad o el sitio de suministro se selecciona deseablemente en base a la identidad y a la condición del mamífero.

La unidad de dosificación del vector adecuado para el suministro de antígeno al mamífero se describe en la presente memoria. El vector se prepara para su administración siendo suspendido o disuelto en un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable tal como una solución salina isotónica, solución de sales isotónicas u otras formulaciones que sean evidentes para los expertos en tales administraciones. El portador apropiado resultará evidente para los expertos en la materia y dependerá en gran medida de la vía de administración. Las composiciones usadas en la invención son administradas a un mamífero de acuerdo con las vías descritas en lo que antecede, en una formulación de liberación sostenida utilizando un polímero biocompatible biodegradable, o mediante un suministro en el sitio utilizando micelas, geles y liposomas. Opcionalmente, la etapa de imprimación incluye también administrar,

con la composición de imprimación, una cantidad adecuada de adyuvante, tal y como se ha definido en la presente memoria.

Las dosificaciones del vector viral dependerán principalmente de factores tales como la condición que se va a tratar, la edad, el peso y la salud del paciente, y puede así variar entre pacientes mamíferos (incluyendo los humanos). Ventajosamente, la potencia inesperada de los adenovirus recombinantes de simio (*por ejemplo*, de chimpancé) permite el uso de una cantidad significativamente más baja de adenovirus recombinante de chimpancé para proporcionar una cantidad efectiva que induzca el efecto inmunogénico deseado (*por ejemplo*, la inducción de un nivel predeterminado de anticuerpos y/o de células CD8+ T).

Por ejemplo, para animales pequeños, una dosis eficaz de un vector adenoviral puede ser proporcionada por 10^5 partículas/ animal y 10^{11} partículas /animal de adenovirus. Para un animal más grande, *por ejemplo* de alrededor de 80 kg, puede ser útil una cantidad de 10^7 a alrededor de 10^{13} partículas por sujeto. Sin embargo, se pueden elegir fácilmente dosis más altas, *por ejemplo*, dependiendo de la vía de suministro seleccionada. Por ejemplo, el vector adenoviral puede ser suministrado en una cantidad que esté comprendida en un rango de aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 100 ml, y más preferiblemente de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20 ml, de solución portadora.

En una realización, una dosificación efectiva del vector de AAV está generalmente comprendida en la gama de alrededor de 0,1 ml a alrededor de 100 ml de solución que contenga concentraciones de alrededor de 1×10^9 a 1×10^{16} genomas del vector de virus. Una dosificación humana preferida para el suministro a órganos grandes (*por ejemplo*, el hígado, los músculos, el corazón y el pulmón), puede ser a partir de alrededor de 5×10^{10} genomas de AAV por kg, en un volumen de alrededor de 1 a 100 ml. Una dosificación preferida para su suministro al ojo es de alrededor de 5×10^9 a 5×10^{12} copias de genoma, en un volumen de alrededor de 0,1 ml a 1 ml.

Dependiendo de las vías de administración deseadas, un experto en la materia puede seleccionar un régimen apropiado. En general, se puede administrar una segunda composición, o inmunización posterior, alrededor de 2 a alrededor de 27 semanas después de administrar la composición de inmunización precedente, al sujeto mamífero. La administración de la composición posterior se lleva a cabo utilizando una cantidad efectiva de una composición que contenga, o que sea capaz de suministrar, el mismo antígeno que el administrado por la composición anterior. Deseablemente, el producto de la composición potenciadora es el mismo, la reacción cruzada, que el codificado por la composición de imprimación.

El período de tiempo entre administraciones secuenciales puede ser ajustado de acuerdo con el orden de suministro mediado de Ad, suministro mediado de AAV, y cualesquiera composiciones adicionales opcionales de imprimación o potenciación (*por ejemplo*, vacunas a base de ADN o a base de proteína). Por ejemplo, se observa un pico de respuesta inmune aproximadamente a los 10 a 14 días siguientes a un suministro mediado de Ad. Sin embargo, la potenciación siguiente a este pico puede generar un segundo pico. Así, puede ser deseable regular en el tiempo la expresión de un antígeno potenciador para que se exprese entre alrededor de 10 a 21 días, o de 18 a 28 días, o de 28 días a 27 semanas después del suministro mediado de Ad. En otro ejemplo, algunos serotipos de AAV demuestran expresión de pico alrededor de 3 a 4 semanas después del suministro. De ese modo, la potenciación que sigue al suministro de AAV puede estar sincronizada para que exprese el antígeno, o un antígeno de reacción cruzada, entre alrededor de 3 semanas y alrededor de 4 semanas, alrededor de 4 semanas a alrededor de 2 meses, o alrededor de 2 meses a alrededor de 27 meses, o más tiempo, después del suministro de AAV.

En una realización el casete de expresión heteróloga suministrado por medio de un vector viral, *por ejemplo*, un vector de AAV, contiene el producto inmunogénico enlazado operativamente a un promotor inducible o regulable. Cuando se utiliza en un régimen, el agente de inducción o de regulación se administra típicamente de tal modo que la expresión del producto se activa inmediatamente después de la administración del vector viral. A continuación, la expresión puede ser extinguida mediante extracción del agente de inducción o de regulación. El régimen puede incluir activación de expresión de "pulso". De ese modo, el procedimiento permite que la expresión sea inducida, extinguida, y después inducida de nuevo tras un período de tiempo. En otra realización, la expresión se induce no tras la administración, sino de varios días a varias semanas después de la administración. Esta realización permite el co-suministro de un Ad y un AAV seguido de inducción (activación) varias semanas después del suministro, dependiendo del retardo causado por el agente de inducción. Por ejemplo, una vez que se ha suministrado un agente de inducción, pueden pasar de 7 a 10 días, o más, antes de que se observe el efecto. Un experto en la materia podrá familiarizarse con el retardo entre el suministro del agente de inducción o de activación y el efecto, y estará capacitado para factorizar fácilmente todo esto en el régimen seleccionado.

Los niveles terapéuticos o niveles de inmunidad del gen seleccionado pueden ser monitorizados con el fin de determinar la necesidad, si la hay, de potenciadores. A continuación de una evaluación de una respuesta de células CD8+ T, o títulos de anticuerpo, en el suero, pueden ser deseables inmunizaciones potenciadoras adicionales opcionales.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto útil para llevar a cabo los regímenes de inmunización descritos en la presente memoria.

5 Un producto de ese tipo puede contener uno o más de los vectores adenovirales descritos en la presente memoria en un contenedor adecuado. Típicamente, tal producto contendrá además instrucciones para la administración de los vectores adenovirales.

10 Además, el producto puede contener un portador fisiológicamente aceptable, adecuado para la vía de suministro elegida, *por ejemplo*, para dilución y/o reconstitución de uno o más de los vectores adenovirales, jeringas, viales y similares.

EJEMPLOS

15 Recientemente, una estrategia que incluye inmunizaciones secuenciales con portadores de vacuna heterólogos que expresan el mismo antígeno, ha dado como resultado la generación de niveles no paralelos de inmunidad específica y, en algunos casos, ha proporcionado protección contra agentes infecciosos.

20 Los vectores adenovirales, de replicación defectuosa, a base de serotipo humano 5 (H5), pueden inducir respuestas celulares robustas y humorales inmunes contra el producto transgén. Adicionalmente, los vectores virales adenoasociados (AAV) han mostrado también que generan respuestas inmunes específicas del antígeno.

Ejemplo 1

25 Para los estudios descritos en el Ejemplo 2, se utilizó glicoproteína envolvente del virus Ébola del Zaire (Ebo GP) con modelo de antígeno para crear vectores de vacuna H5CMVGP y AAV-CMVGP. Se eligió el serotipo 1 de AAV debido a que es altamente eficaz en la transducción muscular.

30 Los vectores utilizados en estos estudios fueron generados con la utilización de procedimientos convencionales, como sigue:

A. Generación de Vector Adenoviral

1. Creación de clones moleculares de EboZ que expresan vectores de adenovirus

35 Genomas recombinantes de adenovirus que derivaban de especies y cepas diferentes de adenovirus y que expresan EboZGP, fueron creados mediante el sistema de ligación directa y selección de verde/ blanco que se describe en otras partes [Gao et al., *Terapia de Genes*, 2003, y Roy et al., *Terapia de Genes Humanos*, 15(5): 519-530 (Mayo de 2004)]. De forma resumida, el cADN del EboZGP fue subclonado en un vector de plásmido pShuttle universal entre el promotor CMV y el poli A de hormona del crecimiento bovina, el cual fue utilizado para introducir el EboZGP en una diversidad de clones moleculares de espinazos de adenovirus.

40 Los clones moleculares de espinazos adenovirales incluyen el serotipo 5 Humano con borrados en E1 y E3 (H5.040), el serotipo 7 de Chimpancé con borrado en E1 solamente (C7.000), borrados en E1 y E3 (C7.010) y borrados en E1 y E4 (C7.001). El proceso de clonación para crear esos clones moleculares ha sido descrito en otros lugares [Gao et al., *Terapia de Genes*, citado anteriormente, 2003, y Roy et al., *Terapia de Genes Humanos*, 15(5): 519-530 (Mayo de 2004)]. Todos estos clones moleculares que contienen un casete expresaron GFP procarriótico a partir del promotor *lac* bacteriano y flanqueado por dos sitios de restricción enrarecidos, PT-Sce I y I-Ceu I. Esto permitió que el casete de expresión de EboZ de construcción pShuttle universal, sea intercambiado en los clones moleculares de adenovirus mediante un proceso de clonación mediada de selección conveniente y eficiente de verde/ blanco (Gao et al., *Terapia de Genes*, 2003).

2. Rescate, expansión y purificación de vectores de AdEboZ

55 Para rescatar virus recombinantes desde los clones moleculares, los ADNs de plásmido fueron linealizados mediante enzimas de restricción apropiada para liberar los genomas de vector desde los espinazos de plásmido, y transfectados en líneas de células apropiadas. Para los vectores borrados en E1/E4, se utilizaron células 10-3, una célula 293 basada en línea de células de complementación E1/E4 con la E4ORF6 expresada bajo inducción de zinc. Para todas las demás construcciones se utilizaron células 293.

60 Una vez completado el efecto citopático (CPE), se observó el signo de rescate y replicación de virus, se cultivó lisato viral crudo para su expansión gradual en infecciones a gran escala en líneas de células apropiadas. Los virus fueron purificados mediante el procedimiento de sedimentación de gradiente de CaCl estándar. Las estructuras de genoma de los virus recombinantes fueron confirmadas mediante análisis de enzima de restricción. Para todos los vectores, excepto para los vectores borrados en E1/E4, se determinó la infectividad de los virus mediante ensayo de placa

sobre células 293. Sin embargo, los vectores utilizados para los experimentos de inmunización fueron dosificados en base a los números de partículas físicas de virus medidos mediante lecturas OD₂₆₀ en un espectrómetro de UV.

B. Creación y producción del vector AAV2/1CMVEboZGP

Para crear el genoma de AAV2 recombinante que expresa la glicoproteína EboZ, el inserto EGFP en el plásmido pAAV2CMVEGFP [E. M. Surace et al., J. Virol., 77(14): 7957-7963 (Julio de 2003)] fue sustituido por cADN de EboZGP.

El virus AAV2/1CMVEboZGP recombinante fue producido mediante el procedimiento de triple transfección en células 293 para transencapsidar el genoma AAV2CMVEboZGP con cápsidas AAV 1. El vector fue purificado mediante el procedimiento de sedimentación de CsCl. El título de copia de genoma del vector fue determinado mediante PCR en tiempo real, mientras que su título infeccioso fue analizado mediante ensayo de centro infeccioso. Las dosis de vector para la vacunación estuvieron basadas en el título de genoma.

Ejemplo 2 – Régimen de inmunización de respuesta inmune potenciada al antígeno

Se adquirieron ratones B10BR (6-8 semanas de edad) en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en el Animal Facility de The Wistar Institute (Filadelfia, PA). Los ratones fueron inmunizados con vectores adenovirales recombinantes o con vectores virales adeno-asociados recombinantes diluidos en 100 µl PBS a las dosis que se proporcionan en lo que sigue, mediante inyección intramuscular. Más en particular, la inmunización se hizo con vectores adenovirales recombinantes a 5×10^{10} , 5×10^9 ó 5×10^8 partículas/ ratón de vector HSGP. La potenciación se hizo con 5×10^{10} copias de genoma/ ratón de AAV2/ vector GP. Se recogió suero de 3 ratones de cada grupo, y se agrupó ya sea en el día 42 después de la inyección (pre-potenciación), o ya sea una semana después de la potenciación, o 2 semanas después de la potenciación, según se ha indicado en la Figura. Las respuestas IgG totales al GP fueron medidas mediante ELISA.

A. Respuesta Inmune Específica del Antígeno

Las respuestas de células T y de células B específicas del antígeno generadas en ratones B10BR, fueron analizadas tras la vacunación mediante inyección 1M con H5CMVGP o bien con vectores AAV-1CMVGP solamente.

El péptido TELRTFSI [ID de SEQ Núm.: 1] que porta el epítipo MHC inmunodominante de EboZ GP para ratones del haplotipo H-2^K, fue sintetizado por Minotopes (Victoria, Australia). El péptido fue diluido en DMSO hasta una concentración de 5 mg/ml y se almacenó a -80 °C. El péptido fue utilizado a 2 µg/ml y las concentraciones de DMSO fueron mantenidas por debajo de un 0,1% (v/v) en una mezcla de prueba final.

Esplenocitos de los ratones inmunizados fueron estimulados con péptido específico de EboZ GP restringido (TELRTFSI, ID de SEQ Núm.: 1) durante 5 horas a 37 °C y 10% de CO₂ en presencia de 1 µl/ml de Brefeldin A (GolgiPlug, BD PharMingen, San Diego, CA). Se incubaron células de control sin péptido. Tras el lavado, las células fueron manchadas con un anticuerpo CD8 anti-ratón etiquetado con FITC (BD PharMingen). A continuación, las células fueron lavadas y permeabilizadas en Cytfix/Cytoperm (BD PharMingen) durante 20 minutos sobre hielo. A continuación, las células fueron lavadas de nuevo y manchadas con un anticuerpo IFN-γ anti-ratón etiquetado con PE (BD PharMingen). Tras lavarlas extensamente, las células fueron examinadas mediante citometría de flujo de dos colores, y se analizaron los datos mediante software WinMDI. Los esplenocitos incubados sin el péptido en GP, mostraron <0,5% IFN-gamma que produjeron células CD8+ T.

Los vectores AAV-1CMVGP a una dosificación de 5×10^{10} copias de genoma por ratón indujeron frecuencias mucho más bajas de IFN-γ productor de células CD8+ T por manchado con citoquina intracelular con péptido H-2^K específico de GP restringido como estimulante y menos respuesta de IgG total al GP medida mediante ELISA a una dosificación de 5×10^8 partículas por ratón.

B. Respuesta Inmune Incrementada al Antígeno

Las respuestas inmunes generadas en ratones B10BR fueron examinadas tras inmunización con H5CMVGP (5×10^8 partículas/ ratón) y potenciación con AAV-1CMVGP (5×10^9 copias de genoma/ ratón).

Los ratones fueron sangrados ya sea mediante punción retro-orbital varias veces tras la inmunización, o ya sea mediante punción cardíaca a la terminación. Se prepararon sueros y se probaron en cuanto a una respuesta IgG total a EboZ GP sobre placas de 96 pocillos cubiertos con EboZ VLPs diluidos en PBS. Las placas estuvieron cubiertas durante la noche a 4 °C y bloqueadas durante 2 horas con PBS que contenía un 3% de albúmina de suero bovino (BSA) a temperatura ambiente. Tras el lavado, los sueros diluidos en PBS que contenía un 1% de BSA, fueron añadidos sobre los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un lavado, se añadió a los pocillos una dilución al 1:10.000 de IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras un lavado, se añadió sustrato de TMB (Sigma Chemicals)

durante 10-20 minutos y la reacción se interrumpió a continuación añadiendo Reactivo de Terminación (Sigma Chemicals), La densidad óptica era roja a 450 nm. Se calculó un valor de corte para muestra positiva como el delta medio OD a 450 nm para suero natural a una dilución de 1:100 más 3 períodos de desviaciones estándar. El título de anticuerpo de punto final de cada muestra probada fue definido a continuación como la inversa de la dilución más alta del suero con un delta OD a 450 nm, el cual fue interpolado de acuerdo con el análisis de regresión lineal, por encima del valor de corte.

Se observó un incremento significativo de respuesta IgG total frente a GP tan pronto como en 10 días tras la potenciación. Más importante, la respuesta IgG total frente a GP conseguida por esta estrategia de imprimación/potenciación fue de al menos 2 a 4 veces más alta que la generada por el H5CMVP solo incluso a una dosis de 5×10^{10} partículas por ratón. Véase la Figura 1.

Ejemplo 3 – Inmunización frente a Ébola utilizando versiones modificadas de cápside de AAV8 y adenovirus que expresan glicoproteínas de envoltorio de Ébola

A. Generación de AAV8 con casetes de inserción

Proteínas vp1 modificadas que tienen insertos en la posición 587 de aminoácido del AAV8, han sido generadas con la utilización de una primera clase de péptidos diseñados para incrementar la transducción de células dendríticas (DC) mediante la incorporación de motivos de enlace de DC conocidos. Estos péptidos han sido ya descritos [T. J. Curiel et al., J. Immunol., 172(12): 7423-31 (2004)].

Con el fin de hacer el AAV más atractivo como portador de vacuna, se intentará incrementar la capacidad del cápside para activar inmunidad innata. Un panel de moléculas seleccionadas que han sido ya descritas para aumentar las respuestas celulares inmunes, algunas de ellas de una manera conocida dependiente de TLR, será fusionado en el cápside de AAV. En esta exposición razonada, el cápside generará el contexto inflamatorio apropiado para el recrudecimiento y la activación de APCs. Mientras que el cápside diseñado actúa como una señal de peligro, la expresión de transgén actuará para la imprimación del sistema inmune adaptativo.

Clase	Proteína/ péptido	#AA	Células objetivo
I	DC3	12	DC
I	DC12	12	DC
I	DC18	12	DC

La inserción en la posición 587 se llevará a cabo mediante mutagénesis de inserción haciendo uso de unión por extensión solapante [Horton, R.M., et al., Gen, 1989, 77(10): 61-68]. Se diseñarán dos conjuntos de imprimadores que dan lugar a dos fragmentos que flanquean el sitio de inserción 587. La propia inserción será codificada en la cola 5' de los imprimadores internos estando seguros de que es suficiente solapamiento para la reasociación en la etapa de unión. Los 2 imprimadores externos codificarán los sitios BsiWI y EcoRV conservados en los plásmidos de empaquetamiento p5E18 (AAV2), pAAV2/ y PAAV2/8. En una segunda reacción PCR, estos dos fragmentos serán unidos entre sí en presencia de los dos imprimadores externos y de los dos fragmentos. El fragmento empalmado será entonces digerido con BsiWI y EcoRV, y posteriormente ligado al vector materno de empaquetamiento digerido de forma similar para generar el plásmido trans pAAV2/8 (modificado).

A continuación se genera el vector AAV2/8 que tiene el cápside modificado, utilizando procedimientos conocidos. Véase, *por ejemplo*, el Ejemplo 1.

B. Generación de AAV8 con proteínas de fusión VP2

Las proteínas de fusión que utilizan las moléculas DC3, DC12 y DC18 de clase 1, serán generadas utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria.

Adicionalmente, las proteínas de fusión vp2 son generadas utilizando una segunda clase de moléculas destinadas a encajar el sistema inmune innato a través de una interacción de receptor-ligando conocida. Este proceso se espera que produzca el medio pro-inflamatorio esencial para una respuesta inmune adaptativa. Mientras tanto, una respuesta pro-inflamatoria fuerte que resulta indeseable para la terapia genética, se considera ventajosa a efectos de vacuna.

Proteína/péptido	Nombre Común	Organismo	#AA	Ligando	Células objetivo
FlaA	Flagelina	L. monocitogenos	287	TLR5	Mono DC
Hsp60	Proteína de deterioro con calor	Humana	573	TLR4	Mono DC
C3d	Componente de Complemento 3 Fragmento d	Humano/Ratón	294	CD21 (CR2)	Célula B fDCs

#AAV: Número de aminoácidos; motivo RGD: un motivo tripéptido Arg-Gly-Diferenciación; (f)DC: (folicular) Célula Dendrítica; Mono: Adhesión celular de soportes Asp de monocitos a través de enlace de un subconjunto de moléculas de integrina.
TLR: Receptor a Modo de Red; CD: Clúster de diferenciación

5 La proteína FlaA ya ha sido descrita [Hayashi, F., et al., Nature, 2001. 410(6832): p. 1099-103]. La proteína Hsp60 ya ha sido descrita [Ohashi, K., et al., J. Immunol., 2000. 164(2): p. 558-61]; la proteína C3d ya ha sido descrita [D'Souza, S.E., et al., Trends Biochem Sci., 1991. 16(7): p. 246-50; M.C. Carroll, Annu. Rev. Immunol., 1998. 16: p. 545-68].

10 Respecto a la fusión de terminal N de VP2, se realizará un conjunto similar de plásmidos de empaquetamiento al descrito por Warrington et al., citado anteriormente, para el AAV8. Un VP21,3 que expresa solamente vector y un plásmido que expresa VP2 a partir de un ATG inicial fuerte mutado, serán construidos según ha sido descrito por los autores. En resumen, para el plásmido que expresa VP21,3 el codón de inicio de VP2 será mutado por mutagénesis dirigida al sitio en codificación GCG para Alanina. El plásmido fuerte de inicio de VP2 (el VP2A) será obtenido mutando posteriormente el AGT de VP1 y VP3 en CGT seguido de la introducción de ATG como inicio de VP2.

15 Con el fin de obtener un sistema flexible para su inserción en la posición 138, se introdujo un enlazador en los plásmidos de empaquetamiento de VP2. Haciendo uso del kit de mutagénesis Quickchange™ (Stratagene, La Jolla, CA) se insertarán los sitios únicos NheI y ClaI tras el codón de inicio de VP2 en la posición 138 de AA. Todos los péptidos pueden ser después insertados mediante PCR a partir del cADN haciendo uso de imprimadores de flanco que codifican los sitios NheI (5') y ClaI (3'). De esta manera, los péptidos pueden ser introducidos en
20 diferentes plásmidos de empaquetamiento de VP2A de una manera uniforme.

El vector AAV2/8 que tiene el cápside modificado se genera a continuación utilizando estos plásmidos trans y procedimientos conocidos. Véase, *por ejemplo*, el Ejemplo 1.

25 C. Régimen de inmunización con (A)

Los animales son imprimados intramuscularmente con un vector adenoviral, *por ejemplo*, el AdH5EboZ GP, a diferentes dosis. Seis semanas más tarde, los animales son potenciados con un AAV8 modificado (que tiene un casete de inserción vp1, preparado según se ha descrito en A), que porta EboZ GP en una dosis de 5×10^{10} copias de genoma por animal. La respuesta de células CD8+ T específica de GP y el título IgG total, pueden ser medidos tanto antes como después de la potenciación.

35 Se obtiene un incremento significativo en la respuesta inmune celular específica de GP y/o una respuesta inmune humoral mejorada.

D. Régimen de inmunización con (B)

40 Los animales son imprimados intramuscularmente con un vector adenoviral, *por ejemplo*, el AdH5EboZ GP, a diferentes dosis. Seis semanas más tarde, los animales son potenciados con AAV modificado (que tiene una proteína de fusión vp2, preparada según se ha descrito en la etapa A) que porta el mismo antígeno (EboZ GP) en una dosis de 5×10^{10} copias de genoma por animal. La respuesta celular CD8+ T específica de GP y el título IgG total, pueden ser medidos tanto antes como después de la potenciación.

45 Se constata un incremento significativo en el título IgG específico de GP mediante ELISA tras la potenciación.

Para el cápside de AAV8 modificado que contiene AlaA, se constata la activación mejorada de DC y el Ag mejorado que expresa el transgén introducido en la célula que presenta el antígeno.

50 En cuanto a los cápsides de AAV8 modificados que contienen hsp60 y C3d, se constata la activación de inmunidad innata.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Los Miembros de Dirección de la Universidad de Pennsylvania, Wilson, James M.
- 5 <120> Suministro Secuencial de Moléculas Inmunogénicas a través de Administraciones de Adenovirus y Mediadas de Virus Adeno-Asociado
- <130> UPN-Q3507PCT
- 10 <150> US 60/565.936
<151> 28-04-2004
- <160> 1
- 15 <170> Versión Patentin 3.3
- <210> 1
<211> 8
<212> PRT
- 20 <213> Artificial
- <220>
<223> Péptido específico de eboz GP restringido en H-2k
- 25 <400> 1

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso de un adenovirus de replicación defectuosa y un virus adeno-asociado en la preparación de un medicamento útil en un régimen de inmunización, comprendiendo el régimen la administración del virus adeno-asociado con anterioridad a la administración del adenovirus de replicación defectuosa,
- 10 comprendiendo el adenovirus de replicación defectuosa un primer casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen la expresión del producto, y
- 15 comprendiendo el virus adeno-asociado (AAV) un segundo casete de expresión heteróloga que comprende secuencia de ácido nucleico que codifica el producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen la expresión del producto.
- 20 2.- Una combinación de un adenovirus de replicación defectuosa y un virus adeno-asociado, para su uso en un régimen de inmunización, comprendiendo el régimen la administración del virus adeno-asociado con anterioridad a la administración del adenovirus de replicación defectuosa,
- 25 comprendiendo el adenovirus de replicación defectuosa un primer casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen la expresión del producto, y
- 30 comprendiendo el virus adeno-asociado (AAV) un segundo casete de expresión heteróloga que comprende secuencia de ácido nucleico que codifica el producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen la expresión del producto.
- 3.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la combinación de acuerdo con la reivindicación 2, en los que las secuencias regulatorias del primer y segundo casetes de expresión del adenovirus de replicación defectuosa y del virus adeno-asociado, difieren.
- 4.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que las secuencias regulatorias del virus adeno-asociado comprenden un promotor inducible.
- 5.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el régimen comprende además suministrar un agente de inducción al sujeto.
- 6.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en los que el régimen comprende la administración del agente de inducción al sujeto a continuación de la administración del AAV.
- 7.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en los que el régimen comprende la administración del agente de inducción al sujeto a continuación de la administración del adenovirus.
- 8.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el adenovirus comprende además un borrado en la región seleccionada en el grupo de regiones de adenovirus consistente en las regiones E2, E3, E4, L1, L2, L3, L4 y L5.
- 9.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el casete de expresión del adenovirus se localiza en el sitio de una región E1.
- 10.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el primer casete de expresión del adenovirus y/o el segundo casete de expresión del virus adeno-asociado, se localizan en la región E3 borrada.
- 11.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el adenovirus es un serotipo seleccionado en el grupo consistente en C5, C6, C7, C68 y C1.
- 12.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el régimen comprende la administración del adenovirus oralmente, intranasalmente o intramuscularmente.
- 13.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el AAV es un serotipo seleccionado en el grupo consistente en AAV1 y AAV8.
- 14.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el régimen comprende la administración del AAV intramuscularmente.

- 15.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el régimen comprende además administrar una vacuna de ADN.
- 5 16.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 15, en los que el régimen comprende la administración de la vacuna de ADN con anterioridad al vector adenoviral o al vector de AAV.
- 17.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el régimen comprende además la administración de una vacuna a base de proteína.
- 10 18.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 17, en los que el régimen comprende el suministro de la vacuna a base de proteína después del vector adenoviral.
- 19.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 17, en los que el régimen comprende el suministro de la vacuna a base de proteína después del vector de AAV.
- 15 20.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 17, en los que el régimen comprende el suministro de la vacuna a base de proteína después del vector adenoviral y del vector de AAV.
- 20 21.- El uso o la combinación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en los que el vector de AAV tiene un cápside modificado que comprende un péptido o un polipéptido heterólogo que incrementa la antigenicidad del vector de AAV.
- 22.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 21, en los que el cápside modificado comprende una proteína vp2 que tiene un péptido fusionado en su terminación N.
- 25 23.- El uso o la combinación de acuerdo con la reivindicación 21, en los que el cápside modificado comprende una proteína vp1 modificada que tiene un péptido insertado en la misma.

FIG. 1

