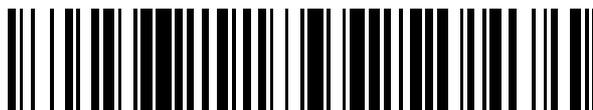


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 954**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2008 E 08714665 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2114459**

54 Título: **Vectores víricos recombinantes para la prevención y la protección contra la infección por alfavirus**

30 Prioridad:

23.02.2007 US 902957 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.01.2014

73 Titular/es:

**HER MAJESTY THE QUEEN, IN RIGHT OF
CANADA, AS REPRESENTED BY THE MINISTER
OF NATIONAL DEFENCE (100.0%)
305 RIDEAU STREET
OTTAWA, ON K1A 0K2, CA**

72 Inventor/es:

**WU, JOSH QIAOHUA y
NAGATA, LESLIE P.**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 439 954 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

Vectores víricos recombinantes para la prevención y la protección contra la infección por alfavirus

- 5 La presente solicitud reivindica los beneficios de prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N° 60/902.957 presentada el 23 de febrero de 2007.

CAMPO DE LA INVENCÓN

- 10 La presente invención se refiere a vectores víricos recombinantes y a vacunas para usar en un procedimiento de protección después de la exposición frente a la infección por alfavirus.

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

- 15 Las encefalitis inducidas por alfavirus están provocadas por virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV), oriental (EEEV) y occidental (WEEV) (Griffin, 2001). Esta enfermedad se caracteriza por fiebre, cefalea persistente, confusión, agitación, dificultad al caminar y convulsiones. En casos graves, pueden acontecer lesiones neurológicas persistentes y la muerte. El VEEV, el EEEV y el WEEV provocan encefalitis en seres humanos con tasas de letalidad diferentes. El EEEV es el más virulento con tasas de letalidad del 30 % al 40 %. En casos mortales, los pacientes
20 mueren habitualmente dentro de un periodo de 2 a 10 días después de la aparición de la encefalitis. En comparación con el EEEV, el WEEV parece ser menos virulento con tasas de letalidad del 10 %. La encefalitis mortal aparece a menudo en niños de pecho y niños pequeños. El VEEV provoca habitualmente una enfermedad de incapacitación aguda con fiebre, escalofríos, cefaleas, dolor muscular, diarrea y vómitos. La encefalitis aparece habitualmente en niños con una tasa de letalidad inferior al 1 %. Aparte de las encefalitis mortales en seres humanos, el VEEV, el
25 EEEV y el WEEV también provocan brotes de la enfermedad en equinos y otros animales domésticos con tasas de letalidad altas. Por lo tanto, estos virus son patógenos emergentes y reemergentes importantes en medicina y veterinaria.

- 30 La estructura de alfavirus consiste en una cubierta proteica denominada envoltura, una cápside y dentro de la cápside un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo (Schlesinger y Schlesinger, 2001). Los dos tercios 5' del genoma de ARN vírico codifican las proteínas no estructurales requeridas para la transcripción y la replicación de los virus. El tercio 3' del genoma vírico codifica las proteínas de la cápside y la envoltura. Las proteínas de la envoltura se codifican mediante un ARNm subgenómico y se derivan mediante la escisión proteolítica del polipéptido E3-E2-6K-E1 en las proteínas E2 y E1 (Strauss y Strauss, 1994). La proteína E2 se une a E1 para formar los picos
35 sobre la superficie del virión. Las proteínas E2 y E1 de alfavirus desencadenan respuestas inmunitarias en el huésped frente a los virus (Das y col., 2004; Hodgson, Ludwig y Smith, 1999; Mathews y Roehrig, 1982).

- 40 El VEEV, el EEEV y el WEEV se transmiten por mosquitos. Los brotes naturales de la enfermedad aparecen cuando los mosquitos que portan los virus pican seres humanos o animales domésticos. No existen transmisiones de ser humano a ser humano de los virus. Por lo tanto, los seres humanos se consideran huéspedes finales. Los brotes de encefalitis inducidas por alfavirus pueden tener un efecto enorme en la salud humana. Por ejemplo, un brote de VEEV en Venezuela y Colombia en 1995 causó más de 75.000 casos con 300 muertes comunicadas (Weaver y col., 1996). Aproximadamente 1.000 casos en seres humanos se registraron en 1941 en el mayor brote de WEEV que ha
45 tenido lugar en Canadá occidental (Reisen y Monath, 1989).

- 50 Aparte de brotes naturales, el VEEV, el EEEV y el WEEV son agentes potenciales de guerra biológica y terrorismo biológico debido a que son muy infecciosos mediante transmisión en aerosol. Por ejemplo, solo 10 a 100 del VEEV en aerosol son suficientes para provocar una infección y se ha informado de al menos 150 casos en seres humanos de infecciones adquiridas en laboratorio (Sidwell y Smee, 2003). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos han clasificado el VEEV, el EEEV y el WEEV como agentes de terrorismo biológico de categoría "B".

- 55 Actualmente no existen vacunas, fármacos antivíricos o productos terapéuticos para la prevención rápida antes de la exposición o la protección después de la exposición frente a encefalitis inducida por alfavirus. Para la prevención antes de la exposición se ha desarrollado una vacuna de VEEV atenuados vivos, denominada TC-83. La vacuna protege operarios de laboratorio de la infección por VEEV. No obstante, del 15 % al 30 % de los receptores de la vacuna desarrollan fiebre, malestar y cefalea y estos efectos secundarios son tan graves que se requiere descanso en cama en aproximadamente la mitad de los receptores de la vacuna (Hoke, 2005). Las vacunas de EEEV y WEEV muertos con estatus de nuevo fármaco en investigación (IND) están disponibles solo para operarios de laboratorio
60 con riesgo a exposición a estos virus. Sin embargo, para ser eficaces, estas vacunas de EEEV y WEEV requieren múltiples inyecciones y refuerzos anuales. Por lo tanto, se necesitan vacunas mejoradas para la prevención rápida antes de la exposición de encefalitis inducidas por alfavirus.

- 65 Debido a que no hay disponibilidad de ningún fármaco o producto terapéutico para la protección después de la exposición frente a encefalitis inducidas por alfavirus, el tratamiento se enfoca en aliviar síntomas clínicos usando procedimientos antihipertérmicos para fiebre y fármacos anticonvulsivos.

Se han propuesto varias estrategias para la protección después de la exposición frente a encefalitis inducidas por alfavirus. La primera es el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón que neutralizan alfavirus. Dichos mAb protegieron aproximadamente el 50 % de ratones frente a la infección por VEEV cuando se les administró 24 h después de la exposición por vía aérea al VEEV virulento (Phillipotts, 2006; Phillipotts, Jones y Howard, 2002). Debido a que los mAb de ratón son muy inmunógenos en seres humanos y no son adecuados para uso humano, estos mAb de ratón se humanizan reemplazando gran parte de la secuencia de aminoácidos de mAb de ratón por los de seres humanos. El noventa por ciento de los ratones infectados por VEEV se curaron después de que se les administró los mAb humanizados dentro de un periodo de 1 h después de la exposición a VEEV y el 75 % se curaron cuando se les administró los mAb humanizados 24 horas después de la exposición al virus (Hunt y col., 2006). Sin embargo, una desventaja de usar mAb para la protección después de la exposición contra encefalitis inducida por alfavirus es que se requiere una cantidad grande de mAb purificado. Por ejemplo, se necesitan hasta 4 mg/kg de mAb para proteger el 50 % de ratones de la infección por VEEV (Phillipotts, Jones y Howard, 2002). Aunque se han desarrollado mAb contra el WEEV (documento de patente de Estados Unidos N° 6.812.329) (Long y col., 2000a; Long y col., 2000b; Yamamoto y col., 1985), no existen informes con respecto a la protección con los mismos de animales frente a la infección por WEEV.

Otra estrategia para la protección después de la exposición frente a encefalitis inducida por alfavirus es el uso de interferón alfa (IFN- α). El IFN- α se produce por parte de células inmediatamente después de la infección por virus. Inhibe la replicación de un espectro amplio de virus induciendo células para sintetizar diversas proteínas antivíricas. La solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/231.433 (número de publicación US2006/0024270) divulga procedimientos para tratar pacientes con encefalitis víricas mediante la inyección de IFN- α . En comparación con pacientes que no recibieron IFN- α , pacientes que recibieron IFN- α dio como resultado una función neurológica y una supervivencia significativamente mejoradas. Sin embargo, el uso clínico de IFN- α para encefalitis vírica está limitado por el requerimiento de inyecciones frecuentes (normalmente cada 24 h durante hasta 14 días) con una dosis grande de IFN- α (3 millones de unidades) y toxicidades asociadas con el IFN- α que incluyen un síndrome similar a la gripe con fiebre, malestar y cefalea. El IFN- α conjugado con polietilenglicol (PEG) prolonga la semivida *in vivo* de IFN- α y su potencia. Por ejemplo, el tratamiento antes de la exposición de ratones con IFN- α conjugado con PEG previno ratones de una exposición por vía subcutánea o en aerosol al VEEV mientras que el tratamiento antes de la exposición con IFN- α no modificado no lo hizo (Grieder y Vogel, 1999; Lukaszewski y Brooks, 2000). Sin embargo, no existen informes que definan si el IFN- α conjugado con PEG podría proteger ratones de encefalitis después de la exposición a VEEV, WEEV o EEEV.

Se han desarrollado varias vacunas experimentales contra el VEEV, el EEEV y el WEEV para la prevención de encefalitis inducidas por alfavirus. Sin embargo, no se han mostrado datos de que estas vacunas experimentales sean eficaces para la protección después de la exposición. La patente de Estados Unidos N° 6.261.570 describe la construcción de vacunas atenuadas vivas para estos alfavirus. Una inyección de dosis única de estas vacunas protegió animales de la exposición a estos virus. No obstante, problemas de efectos secundarios y la reversión a la virulencia de virus de tipo silvestre pueden impedir su uso en seres humanos. Una vacuna experimental de ADN para el WEEV protegió completamente ratones de la exposición a WEEV (Nagata y col., 2005). De forma similar a la vacuna de WEEV muertos, no obstante, la vacuna experimental de ADN requiere tres inyecciones para ser eficaz. Varios grupos demostraron que vacunas de VEEV con vectores víricos protegieron ratones de la exposición a VEEV (Paessier y col., 2006; Perkins, O'Brien y Phillipotts, 2006; Phillipotts y col., 2005; patente de Estados Unidos N° 6.936.257). La patente de Estados Unidos N° 6.565.853 da a conocer un adenovirus que codifica un polipéptido que produce una respuesta inmunitaria protectora frente a un alfavirus, tal como un VEEV, cuando se administra a un mamífero.

Finalmente, se han desarrollado varios fármacos experimentales contra alfavirus. Por ejemplo, Poly ICLC, un inmunomodulador basado en ácido nucleico, induce la producción de interferón y activa las células citolíticas naturales. El poli ICLC encapsulado por liposomas ofrece el 100 % de protección frente a la exposición por vía intranasal mortal al WEEV (Wong y col., 2005). No obstante, no se han comunicado datos sobre la protección después de la exposición. Otros fármacos experimentales tales como triarilpirazolina (Puig-Basagoiti y col., 2006), ribocima (Seyhan y col., 2002), la proteína antivírica de dedo de cinc (Bick y col., 2003) y lactoferrina humana (Waarts y col., 2005) inhiben la replicación de alfavirus en un sistema de cultivo celular; sin embargo, no se sabe si estos fármacos experimentales son eficaces en la prevención o el tratamiento de encefalitis inducidas por alfavirus en animales.

La presente invención aborda un aspecto importante de contramedidas médicas frente a alfavirus, a saber, proteger rápidamente frente a encefalitis inducida por alfavirus después de la exposición a los virus. La presente invención puede usarse para prevenir las encefalitis si tuvieran lugar los escenarios siguientes: un ataque bioterrorista o una guerra biológica en la que se liberan deliberadamente virus al público o al personal militar, un brote natural de VEEV o EEEV o WEEV y un accidente de laboratorio en el que los operarios del laboratorio están en riesgo de exposición a estos virus.

Lista de literatura de la técnica anterior

- 5 Bartelloni, P. J., McKinney, R. W., Calia, F. M., Ramsburg, H. H. y Cole, F. E., Jr. (1971). *Am J Trop Med Hyg* 20(1), 146-9.
- Bick, M. J., Carroll, J. W., Gao, G., Goff, S. P., Rice, C. M. y MacDonald, M. R. (2003). *J Virol* 71(21), 11555-62.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A. y Mehtali, M. (1996). *J Virol* 70(7), 4805-10.
- 10 Das, D., Gares, S. L., Nagata, L. P. y Suresh, M. R. (2004). *Evaluation of a Western Antiviral Res* 64(2), 85-92.
- Grieder, F. B. y Vogel, S. N. (1999). *Virology* 257(1), 106-18.
- 15 Griffin, D. E. (2001). Alphaviruses. 4ª ed. En "Fields Virology" (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, páginas 2265-2300. 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5), 2509-14.
- 20 Hodgson, L. A., Ludwig, G. V. y Smith, J. F. (1999). *Vaccine* 17(9-10), 1151-60.
- Hoke, C. H., Jr. (2005). *Mil Med* 170(4 Supl), 92-105.
- Hunt, A. R., Frederickson, S., Hinkel, C., Bowdish, K. S. y Roehrig, J. T. (2006). *J Gen Virol* 87(Pt 9), 2467-76.
- 25 Long, M. C., Jager, S., Mah, D. C., Jebailey, L., Mah, M. A., Masri, S. A. y Nagata, L. P. (2000a). *Hybridoma* 19(1), 1-13.
- Long, M. C., Nagata, L. P., Ludwig, G. V., Alvi, A. Z., Conley, J. D., Bhatti, A. R., Suresh, M. R. y Fulton, R. E. (2000b). *Hybridoma* 19(2), 121-7.
- 30 Lukaszewski, R. A. y Brooks, T. J. (2000). *J Virol* 74(11), 5006-15.
- Mathews, J. H. y Roehrig, J. T. (1982). *J Immunol* 129(6), 2763-7.
- 35 Nagata, L. P., Hu, W. G., Masri, S. A., Rayner, G. A., Schmaltz, F. L., Das, D., Wu, J., Long, M. C., Chan, C., Proll, D., Jager, S., Jebailey, L., Suresh, M. R. y Wong, J. P. (2005). *Vaccine* 23(17-18), 2280-3.
- Nagata, L. P., Hu, W. G., Parker, M., Chau, D., Rayner, G. A., Schmaltz, F. L., y Wong, J. P. (2006). *J Gen Virol* 87(Pt 8), 2353-61.
- 40 Netolitzky, D. J., Schmaltz, F. L., Parker, M. D., Rayner, G. A., Fisher, G. R., Trent, D. W., Bader, D. E. y Nagata, L. P. (2000). *J Gen Virol* 81(Pt 1), 151-9.
- 45 Paessler, S., Ni, H., Petrakova, O., Fayzulín, R. Z., Yun, N., Anishchenko, M., Weaver, S. C. y Frolov, I. (2006). *J Virol* 80(6), 2784-96.
- Perkins, S. D., O'Brien, L. M. y Phillipotts, R. J. (2006). *Vaccine* 24(17), 3440-5.
- 50 Phillipotts, R. J. (2006). *Virus Res* 120(1-2), 107-12.
- Phillipotts, R. J., Jones, L. D. y Howard, S. C. (2002). *Vaccine* 20(11-12), 1497-504.
- Phillipotts, R. J., O'Brien, L., Appleton, R. E., Carr, S. y Bennett, A. (2005). *Vaccine* 23(13), 1615-23.
- 55 Puig-Basagoiti, F., Tilgner, M., Forshey, B. M., Philpott, S. M., Espina, N. G., Wentworth, D. E., Goebel, S. J., Masters, P. S., Falgout, B., Ren, P., Ferguson, D. M. y Shi, P. Y. (2006). *Antimicrob Agents Chemother* 50(4), 1320-9.
- 60 Reisen, W. K. y Monath, T. P. (1989). En "The arboviruses: epidemiology and ecology" (T. P. Monath, Ed.), Vol. V, páginas 89-137. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Schlesinger, S. y Schlesinger, M. J. (2001). 4ª Edición ed. En "Fields Virology" (D. M. Knipe y P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, páginas 2265-2300. 2 vol. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.
- 65

Seyhan, A. A., Vitiello, D., Shields, M. T. y Burke, J. M. (2002). *J Biol Chem* 277(29), 25957-62.

Sidwell, R. W. y Smee, D. F. (2003). *Antiviral Res* 57(1-2), 101-11.

5 Strauss, J. H. y Strauss, E. G. (1994). *Microbiol Rev* 58(3), 491-562.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4350-4.

10 van Pesch, V., Lanaya, H., Renauld, J. C. y Michiels, T. (2004). *J Virol* 78(15), 8219-28.

Waarts, B. L., Aneke, O. J., Smit, J. M., Kimata, K., Bittman, R., Meijer, D. K. y Wilschut, J. (2005). *Virology* 333(2), 284-92.

15 Weaver, S. C., Salas, R., Rico-Hesse, R., Ludwig, G. V., Oberste, M. S., Boshell, J. y Tesh, R. B. (1996). *Lancet* 348(9025), 436-40.

Wong, J. P., Nagata, L. P., Christopher, M. E., Salazar, A. M. y Dale, R. M. (2005). *Vaccine* 23(17-18), 2266-8.

20 Yamamoto, K., Hashimoto, K., Chiba, J. y Simizu, B. (1985). *J Virol* 55(3), 840-2.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El ámbito de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

25 Se divulgan también procedimientos para prevenir rápidamente encefalitis inducidas por alfavirus antes de la exposición o después de la exposición a alfavirus. Más específicamente, la prevención antes de la exposición incluye una administración de dosis única de vectores de adenovirus (Ad) recombinantes que expresan IFN- α o una administración de dosis única de vectores Ad recombinantes que expresan las proteínas de la envoltura de alfavirus o una administración de dosis única simultánea de vectores de Ad recombinantes que expresan IFN- α y vectores Ad recombinantes que expresan las proteínas de la envoltura de alfavirus. Como alternativa, la protección rápida puede lograrse mediante la administración de dosis única de vectores Ad recombinantes que coexpresan tanto IFN- α como las proteínas de la envoltura de alfavirus. Mediante este enfoque, puede provocarse una respuesta de protección frente a encefalitis inducidas por alfavirus menos de una semana después de la administración de los vectores Ad recombinantes.

35 La protección antes de la exposición incluye una administración de dosis única de vectores Ad recombinantes que expresan IFN- α o una administración de dosis única de vectores Ad recombinantes que expresan las proteínas de la envoltura de alfavirus o una administración de dosis única simultánea de vectores de Ad recombinantes que expresan IFN- α y vectores Ad recombinantes que expresan las proteínas de la envoltura de alfavirus. Alternativamente, la protección puede obtenerse mediante una administración de dosis única de vectores Ad recombinantes que expresan tanto IFN- α como las proteínas de la envoltura de alfavirus, en la que el IFN- α expresado por los vectores Ad recombinantes inhibe rápidamente en primer lugar la replicación de alfavirus; después esta inhibición se potencia y se prolonga mediante respuestas inmunitarias específicas provocadas por las proteínas de la envoltura expresadas por unos segundos vectores Ad recombinantes o por los mismos.

45 En consecuencia, se divulga un procedimiento de prevención rápida (inferior a una semana) de un animal susceptible de padecer encefalitis inducida por alfavirus antes de que el animal se exponga a alfavirus mediante la administración de una dosis única, una vacuna de actuación rápida que comprende vectores víricos recombinantes que expresan las proteínas estructurales de alfavirus o mediante la administración de una dosis única de vectores víricos recombinantes que expresan IFN- α . Como alternativa, la protección rápida antes de la exposición puede lograrse mediante una administración simultánea de dosis única de la vacuna y el IFN- α proporcionado por los vectores víricos recombinantes o mediante la administración de dosis única de vectores víricos recombinantes que coexpresan tanto proteínas estructurales de alfavirus como IFN- α .

55 Además, se divulga un procedimiento de prevención de un animal susceptible de padecer encefalitis inducida por alfavirus después de que el animal se exponga a alfavirus mediante la administración de una vacuna de dosis única de actuación rápida que comprende vectores víricos recombinantes que expresan las proteínas estructurales de alfavirus o mediante la administración de una dosis única de vectores víricos recombinantes que expresan IFN- α . Como alternativa, la protección después de la exposición rápida puede lograrse mediante una administración simultánea de dosis única de la vacuna y el IFN- α proporcionado por los vectores víricos recombinantes o mediante la administración de dosis única de vectores víricos recombinantes que coexpresan tanto proteínas estructurales de alfavirus como IFN- α .

60

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIG. 1** muestra etapas detalladas de la construcción del plásmido pAd5-mIFN α . El gen que codifica IFN- α de ratón se insertó en el genoma de ADN del serotipo 5 de adenovirus 5 (Ad5) humano mediante la recombinación homóloga en *Escherichia coli* (*E. coli*). El virus derivado de este plásmido se denomina Ad5-mIFN α .

La **FIG. 2** muestra tres etapas principales del ensamblaje del gen que codifica las proteínas de la envoltura de la cepa 71V-1658 del WEEV. El gen que codifica la proteína de la envoltura E3-E2 se clonó en primer lugar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un plásmido mediante clonación TOPO. El fragmento de ADN que codifica E3-E2 se verificó mediante secuenciación de ADN, se digirió con enzimas de restricción y se ligó con el fragmento de ADN que codifica la proteína de la envoltura 6K-E1. El plásmido pcD3-WEEV se usó para fabricar un clon de Ad5 infeccioso de longitud completa pAd5-WEEV. El virus derivado de este plásmido se denomina Ad5-WEEV.

La **FIG. 3** muestra la caracterización de Ad5-mIFN α que expresa IFN- α de ratón. El panel A muestra un diagrama esquemático del genoma vírico de Ad5-mIFN α . La longitud del genoma vírico (en color rosa) es de 31.686 pb con deleciones en las regiones E1 y E3 (Δ E1 y Δ E3). Las repeticiones terminales invertidas izquierda y derecha se mostraron como casillas negras rellenas en ambos extremos del genoma. Un casete de expresión de IFN- α se compone de P_{CMV} (promotor inmediato temprano de citomegalovirus, en marrón oscuro), la región que codifica IFN- α de ratón (en verde oscuro) y P_A (señal de poliadenilación de SV40; en azul oscuro). Los cebadores usados para la amplificación por PCR del gen de IFN- α de ratón se muestran como flechas negras rellenas. El panel B muestra la detección del gen de IFN- α de ratón en el genoma vírico de Ad5-mIFN α . El gen IFN- α se amplificó por PCR usando el ADN vírico extraído del ADN vírico purificado de Ad5-mIFN α (carril 2) o Ad5-EGFP, un vector Ad5 de control que expresa la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) (carril 3). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 0,8 %. Carril 1, marcador en escalera de ADN (Ladder) de 1 kb (Sigma). El panel C muestra la expresión de IFN- α de ratón mediante Ad5-mIFN α . Las proteínas de los sobrenadantes de células 293 infectadas con mock (carril 3) o infectadas con Ad5-EGFP (carril 4) o infectadas con Ad5-mIFN α (carril 5) se recogieron 48 h después de la infección y se separaron mediante SDS-PAGE al 12 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se visualizaron tiñendo el gel con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Carril 1, patrón de proteína multicolorado MultiMark (Invitrogen). Carril 2, carril vacío (la banda en este carril se debe a la extensión de la muestra del carril 3). El panel D muestra la detección de IFN- α de ratón expresado a partir de Ad5-mIFN α por inmunotransferencia (Western). Las proteínas de los sobrenadantes recogidas a partir de células 293 infectadas con mock (carriles 3 y 6), o células 293 después de 24 h y 48 h después de la infección con Ad5-EGFP (carriles 4, 5), o células 293 después de 24 h y 48 h después de la infección con Ad5-mIFN α (carriles 7 y 8) se recogieron por separado mediante SDS-PAGE al 12 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron mediante anticuerpos policlonales de conejo contra mIFN- α (Calbiochem). Carril 1, patrón multicolorado MultiMark (Invitrogen); Carril 2, el IFN- α de ratón recombinante producido en *E. coli* (Calbiochem).

La **FIG. 4** muestra la caracterización de Ad5-WEEV que expresa proteínas de la envoltura (E3-E2-6K-E1) de la cepa 71V-1658 de WEEV. El panel A muestra la representación esquemática del casete de expresión para las proteínas de la envoltura de WEEV clonado en vectores Ad5. P_{CMV}: el promotor inmediato temprano de citomegalovirus humanos; P_A: la señal de poliadenilación de virus de simio 40; Δ E1 y Δ E3: deleciones en genes E1 y E3 del genoma de Ad5. El panel B muestra la detección por PCR del gen que codifica E3-E2-6K-E1 en Ad5-WEEV. Carril 1, marcador en escalera de masa de ADN alta de Invitrogen; Carril 2, el producto de PCR de la amplificación de Ad5-WEEV. El Panel C muestra la detección por inmunotransferencia (Western) de las proteínas E1 y E2 expresadas a partir de Ad5-WEEV. Los extractos de proteínas de células 293 infectadas con mock (carriles 2 y 6), o infectadas con Ad5-EGFP (carriles 3 y 7), o infectadas con Ad5-WEEV (carriles 4 y 8) se separaron mediante SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron con mAb 11D2 específico de E1 y mAb 3F3 específico de E2. Carril 1, patrón multicolorado MultiMark (Invitrogen).

La **FIG. 5** muestra la protección después de la exposición de ratones frente a la infección por WEEV después de la coadministración de Ad5-mIFN α que expresa IFN- α de ratón y Ad5-WEEV que expresa las proteínas de la envoltura de WEEV. El Panel A muestra el porcentaje de supervivencia de ratones a los que se inyectó Ad5-mIFN α y Ad5-WEEV después de la exposición por vía intranasal a la cepa Fleming de WEEV. El Panel B muestra la gravedad de la infección por WEEV después de la exposición a la cepa de WEEV Fleming de ratones a los que se inyectó diferentes combinaciones de Ad5-mIFN α y Ad5-WEEV o Ad5-EGFP y controles de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los ratones se clasificaron diariamente durante 4 días después de la provocación según la gravedad de la infección en base a la escala siguiente: 0, normal; 1, pelo ligeramente ondulado, muy activo, ningún signo visible de infección; 2, pelo muy ondulado, signos definitivos de infección, no como si estuviera activo, pero aún se mueve bastante; 3, pelo muy ondulado, postura encorvada, movilidad reducida; y 4, pelo muy ondulado, postura encorvada, poca o nula movilidad, respiración rápida. El Panel C muestra la gravedad de la infección por WEEV después de la exposición a la cepa de WEEV Fleming de ratones a los que se inyectó Ad5-mIFN α solo y a los que se administró Ad5-WEEV y Ad5-mIFN α . Se realizó un

seguimiento diario de los ratones durante 14 días después de la exposición para determinar la gravedad de la infección mediante el sistema de clasificación descrito en el Panel B.

La **FIG. 6** muestra la protección antes de la exposición de ratones frente a la infección por WEEV después de la administración de Ad5-mIFN α que expresa IFN- α de ratón o Ad5-WEEV que expresa las proteínas de la envoltura de WEEV. El Panel A muestra el porcentaje de supervivencia de ratones a los que se inyectó por vía intramuscular (IM) o por vía intranasal (IN) Ad5-mIFN α después de la exposición por vía intranasal a 71 V-1658. El Panel B muestra el porcentaje de supervivencia de ratones a los que se inyectó IM Ad5-WEEV después de la exposición por vía intranasal a 71 V-1658. Los ratones se clasificaron diariamente durante 14 días después de la exposición según la gravedad de la infección en base al sistema de clasificación descrito en la leyenda de la Figura 5.

La **FIG. 7** muestra la protección antes de la exposición de ratones frente a infección por diferentes cepas de WEEV después de la administración IM de Ad5-WEEV que expresa las proteínas de la envoltura de la cepa 71 V-1658 de WEEV. La figura ilustra el porcentaje de supervivencia de ratones a los que se ha inyectado IM Ad5-WEEV después de la exposición intranasal a la cepa de WEEV 71V-1658 o la cepa de WEEV CBA87 o la cepa de WEEV Fleming. Los ratones se clasificaron diariamente durante 14 días después de la exposición según la gravedad de la infección.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los virus son microorganismos extremadamente sencillos que crecen y se multiplican solo en células vivas. Para comenzar la infección, los virus se unen a las células mediante receptores e inyectan sus genes en las células iniciando una cascada de expresiones génicas que conducen al ensamblaje de nuevas partículas víricas. Debido a que los virus son muy eficaces en suministrar sus genes a las células, se han modificado como vectores para la expresión de genes extraños en animales. Para manipular un virus como un vector de suministro génico, se inserta un gen extraño en una región dentro del genoma vírico. La inserción del gen en el genoma vírico interrumpe genes víricos esenciales requeridos para la replicación vírica. Por lo tanto, los virus manipulados provocan una infección de punto final en la que el virus es capaz de unirse a las células y suministrar el gen extraño en las células pero es incapaz de producir nuevas partículas víricas.

Los adenovirus (Ad) se han usado ampliamente como vectores víricos para el suministro génico y el desarrollo de vacunas. Los vectores Ad pueden suministrar proteínas terapéuticas tales como IFN- α para combatir infecciones víricas. La expresión mediada por Ad de IFN- α actúa como bombas de infusión que producen constantemente IFN- α en animales durante la vida útil de vectores Ad y evita inyecciones múltiples de IFN- α . Para desarrollar vacunas basadas en Ad, el gen que codifica un antígeno heterólogo puede suministrarse y expresarse por vectores Ad en animales, dando como resultado la inducción de respuestas inmunitarias. Se han usado vectores Ad para fabricar vacunas experimentales frente al VEEV. Las vacunas de VEEV con vectores Ad previnieron ratones de la provocación en forma de aerosol de VEEV cuando se usaron solas (Phillpotts y col., 2005) o combinadas con una vacuna de ADN (Perkins, O'Brien y Phillipotts, 2006); sin embargo, no existe ningún informe sobre protección después de la exposición frente a VEEV usando estas vacunas. Tampoco ha habido ningún informe sobre vacunas con vectores Ad para WEEV o EEEV.

La presente invención usa WEEV como un patógeno modelo de alfavirus para demostrar que la coadministración de vectores que expresan IFN- α y las proteínas de la envoltura de WEEV protege ratones de encefalitis después de la exposición al virus.

Para construir vectores Ad que expresen IFN- α o las proteínas de la envoltura de la cepa 71-1658 de WEEV, los inventores de la presente invención fabricaron plásmidos de adenovirus de tipo 5 (Ad5) humano infeccioso que contenían un casete de expresión bien para IFN- α de ratón o bien las proteínas de la envoltura usando un procedimiento de recombinación homóloga descrito en la literatura (Chartier y col., 1996; He y col., 1998) (FIG. 1; FIG. 2). El casete de expresión contiene el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), el gen que codifica IFN- α de ratón o las proteínas de la envoltura de WEEV y una señal de poliadenilación de virus de simio 40 (SV40). El casete de expresión se dispuso en la región E1 de Ad5 entre los nucleótidos (nt) 400 y 1.918 del genoma vírico (FIG. 3, Panel A; FIG. 4, Panel A). La disposición del casete en la región E1 hace que la replicación de vectores Ad5 sea defectuosa. Los plásmidos Ad5 infecciosos de longitud completa se transflectaron en células 293 para generar vectores Ad5 denominados Ad5-mIFN α y Ad5-WEEV.

Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la totalidad de la región codificante de IFN- α de ratón para asegurar que el gen IFN- α de ratón está presente en el genoma de ADN vírico de Ad5-mIFN α . Después de la amplificación, el producto de PCR se separó en gel de agarosa y se visualizó con tinción con bromuro de etidio. La FIG. 3, Panel B muestra que aparece una banda de ADN correspondiente al tamaño (569 pb) del gen IFN- α de ratón en la reacción por PCR de Ad5-mIFN α (carril 2). Esta banda se especificó para Ad5-mIFN α debido a que dicha banda no pudo verse en la reacción por PCR del vector de control Ad5-EGFP (carril 3). Este resultado confirma la presencia del gen IFN- α de ratón en Ad5-mIFN α .

Habiendo demostrado que el gen IFN- α de ratón estaba presente en el genoma vírico de Ad5-mIFN α , los inventores de la presente invención quieren conocer después si el IFN- α de ratón podría expresarse en células infectadas con Ad5-mIFN α . Para hacer esto, se infectaron células 293 con mock o se infectaron con Ad5-EGFP o Ad5-mIFN α . Después de 48 h después de la infección, los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % que contenía dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Después de la electroforesis, el gel se tiñió con azul de Coomassie. Como se muestra en la FIG. 3, Panel C, se mostró una banda que corresponde a la masa molecular de 24 kilodalton (kDa) en el sobrenadante de células 293 infectadas con Ad5-mIFN α (carril 5, indicado por una flecha negra). La banda de 24 kDa estaba ausente en el sobrenadante de células infectadas con mock (carril 3) o células 293 infectadas con Ad5-EGFP (carril 4), lo que sugiere que la banda era específica de las células infectadas con Ad5-mIFN α .

Se llevó a cabo una inmunotransferencia (Western) para determinar si la banda de proteína de 24 kDa es IFN- α de ratón. Las células 293 estaban infectadas con mock, infectadas con Ad5-EGFP o Ad5-mIFN α . 24 y 48 h después de la invención, los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron y se sometieron a SDS-PAGE al 12 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron con anticuerpos policlonales de conejo contra IFN- α de ratón. La FIG. 3, Panel D muestra que los anticuerpos reconocieron una banda de proteína ancha con la masa molecular de aproximadamente 24 kDa en sobrenadantes recogidos a partir de células 293 después de 24 h (carril 7) y 48 h (carril 8) de la infección con Ad5-mIFN α . No se detectó dicha banda de proteína en células 293 infectadas con mock (carriles 3 y 6) o infectadas con Ad5-EGFP (carriles 4 y 5). Estos resultados confirmaron que la banda de proteína de 24 kDa de células infectadas con Ad5-mIFN α es IFN- α de ratón y la masa molecular era consecuente con los hallazgos previos (van Pesch y col., 2004). La masa molecular del IFN- α de ratón expresado a partir de células infectadas con Ad5-mIFN α (carriles 7 y 8) es superior (24 kDa) a la del IFN- α de ratón expresado en *E. coli* (carril 2; 19 kDa). Como se ha informado previamente (van Pesch y col., 2004), la masa molecular superior del IFN- α de ratón expresada a partir de células de mamífero es debida a la glicosilación del proteína, que está ausente en el sistema de expresión de *E. coli*. En resumen, los inventores de la presente invención demostraron que el gen IFN- α de ratón se insertó en el genoma de Ad5 y el IFN- α de ratón se produjo a partir de células infectadas con Ad5-mIFN α .

La presencia del gen que codifica las proteínas de la envoltura de la cepa 71V-1658 de WEEV en Ad5-WEEV también se verificó por PCR. La totalidad de la región codificante de la proteína de la envoltura E3-E2-6K-E1 se purificó y el producto de PCR se separó en gel de agarosa y se visualizó con tinción por bromuro de etidio. La FIG. 4, Panel B muestra que aparece una banda de ADN que corresponde al tamaño (2,9 kb) de la totalidad de la región codificante E3-E2-6K-E1 en la reacción por PCR de Ad5-WEEV (carril 2), lo que indica la presencia del gen E3-E2-6K-E1 en el genoma de Ad5-WEEV.

Se usó inmunotransferencia (Western) para confirmar la expresión de las proteínas de la envoltura a partir de Ad5-WEEV. Se infectaron 293 células con mock, o se infectaron con Ad5-EGFP o con Ad5-WEEV. 24 y 48 h después de la invención, los lisados de células se recogieron y se sometieron a SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron, respectivamente, con mAb 11D2 específico de la proteína de la envoltura E1 de WEEV y mAb 3F3 específico de la proteína de la envoltura E2 (Long y col., 2000b): Se hizo reaccionar mAb 11D2 con una banda de proteína con una masa molecular de aproximadamente 47 kDa en las células infectadas con Ad5-WEEV (FIG. 4, Panel C, carril 4). De forma similar, se hizo reaccionar mAb 3F3 con una banda de proteína con una masa molecular de aproximadamente 47 kDa en los lisados de células recogidos a partir de células infectadas con Ad5-WEEV (FIG. 4, Panel C, carril 8). Ninguna de dichas bandas de proteínas se mostró en células 293 infectadas con mock (FIG. 4, Panel C, carriles 2 y 6) o infectadas con Ad5-EGFP (FIG. 4, Panel C, carriles 3 y 7). La banda de proteína de 47 kDa detectada con 11D2 o 3F3 es consecuente con la masa molecular de la proteína de la envoltura E1 o E2 de la cepa de WEEV 71V-1658 (Das y col., 2004; Long y col., 2000b).

Para determinar si Ad5-WEEV puede inducir respuestas inmunitarias en animales, los inventores de la presente invención examinaron anticuerpos de neutralización contra WEEV en sueros recogidos de los ratones inmunizados con Ad5-WEEV. Se inyectó a cada ratón de un grupo de 6 ratones por vía intramuscular (IM) 10^7 ufp de Ad5-WEEV y recibieron un refuerzo 4 semanas después de la misma dosis de Ad5-WEEV. Como controles, se administró a 3 grupos de ratones que contenían cada uno 6 ratones PBS, una vacuna de WEEV muerta (Bartelloni y col., 1971) o Ad5-EGFP. Los sueros de ratones sin tratamiento y de ratones 11 días después de cada inoculación se recogieron y se detectaron anticuerpos de neutralización contra WEEV en sueros agrupados de cada grupo mediante un ensayo de neutralización por reducción de placas (PRN). Los ratones que recibieron Ad5-WEEV desarrollaron los anticuerpos de neutralización de WEEV a unas valoraciones de 1:20 después de la primera inyección. Después de los refuerzos, las valoraciones de los anticuerpos de neutralización se incrementaron 8 veces (1:160). No se detectó ningún anticuerpo de neutralización de WEEV en los sueros de los ratones a los que se inoculó PBS, la vacuna de WEEV muerta o Ad5-EGFP. Estos resultados demostraron que la respuesta inmunitaria humoral se indujo después de una inyección de dosis única de Ad5-WEEV y la respuesta pudo potenciarse después del refuerzo.

Los investigadores de la presente invención determinaron en siguiente lugar si la coadministración de los vectores Ad que expresan IFN- α de ratón y las proteínas de la envoltura de WEEV podrían proteger ratones de la infección por WEEV después de la exposición al virus. En primer lugar los ratones se provocaron por vía intranasal (IN) con

1,5 x 10³ ufp de la cepa Fleming de WEEV. A las 6 h después de la exposición al virus, se administraron a los ratones 10⁷ ufp de Ad5-WEEV solo, o 10⁷ ufp de Ad5-mIFN α solo, o 10⁷ ufp de Ad5-WEEV y 10⁷ ufp de Ad5-mIFN α . Como controles, se inyectó a dos grupos de ratones PBS o Ad5-EGFP. Para los ratones expuestos a la cepa Fleming de WEEV y a los que se inoculó subsiguientemente tanto Ad5-WEEV como Ad5-mIFN α , 7 de 8 ratones sobrevivieron (FIG. 5, Panel A). Tres de los ratones en este grupo mostraron signos de infección el día 6, 7 y 8 después de la exposición (FIG. 5, Panel C); sin embargo, el día 9, todos los ratones excepto uno se recuperaron completamente. En el grupo al que se inoculó Ad5-mIFN α , 4 de 8 ratones mostraron signos de infección el día 7 después de la exposición y no se recuperaron nunca (FIG. 5, Panel C). Tres de estos 4 ratones enfermos murieron el día 11, 13 y 14 después de la exposición (FIG. 5, Panel A). Por el contrario, 7 de 8 ratones a los que se inoculó Ad5-WEEV estaban muertos solo el día 4 después de la exposición (FIG. 5, Panel A). De forma similar, todos los ratones de grupos de control a los que se administró PBS o Ad5-EGFP estaban muertos el día 4 (FIG. 5, Panel A). Los ratones de grupos de control enfermaron el día 3 después de la exposición al virus y murieron el día 4 (FIG. 5, Panel B). El rápido progreso de la infección de la cepa de WEEV Fleming en los grupos de control fue consecuente con nuestras observaciones previas (Nagata y col., 2006). Por lo tanto, una inyección de dosis única de vectores Ad que expresan IFN- α de ratón y vectores Ad que expresan las proteínas de la envoltura de WEEV protegieron a aproximadamente el 90 % de los ratones de encefalitis después de la exposición a una dosis mortal de WEEV. Por el contrario, una inyección de dosis única de vectores Ad que expresan IFN- α de ratón protegieron a solo el 60 % de los ratones de la enfermedad mientras que la administración de vectores Ad que expresan las proteínas de la envoltura de WEEV no proporcionó ninguna protección. Por lo tanto, estos datos demuestran que se requiere la coadministración de vectores Ad para lograr protección.

Para determinar si la administración de los vectores Ad que expresan IFN- α de ratón podría proteger ratones de la infección por WEEV antes de la exposición al virus, se inyectó a los ratones, en primer lugar, IM o IN, 10⁷ ufp de Ad5-mIFN α y se expusieron por vía intranasal (IN) 48 h después a 1,5 x 10³ ufp de la cepa 71V-1658 de WEEV. Como controles, se inyectó a grupos de ratones PBS o Ad5-EGFP. Los ratones a los que se inyectó IM o IN Ad5-mIFN α sobrevivieron todos (FIG. 6, Panel A). Por el contrario, menos del 50 % de ratones de los grupos de control de PBS y menos del 25 % de ratones en el control de Ad5-EGFP sobrevivieron. Además, los inventores de la presente invención encontraron que la protección completa se obtuvo en ratones a los que se administró Ad5-mIFN α y se expusieron 1 semana después a la cepa 71V-1658 de WEEV (no se muestran datos). La protección rápida antes de la exposición también se logró en ratones inmunizados con Ad5-WEEV (FIG. 6, Panel B). A estos ratones se les inyectó IM en primer lugar 10⁷ ufp de Ad5-WEEV y se expusieron por vía intranasal (IN) 1 semana después a 1,5 x 10³ ufp de la cepa 71V-1658 de WEEV. Como controles, se inyectó a grupos de ratones PBS o Ad5-EGFP. Los ratones inmunizados con Ad5-WEEV estuvieron todos protegidos. Por el contrario, casi todos los ratones de los grupos de control estaban muertos el día 14 después de la exposición (FIG. 6, Panel B). De forma no sorprendente, los ratones a los que se inyectó tanto Ad5-WEEV como Ad5-mIFN- α estuvieron también completamente protegidos de la exposición mortal al WEEV dentro de un periodo de 1 semana después de la inyección (no se muestran datos). Adicionalmente, se observó que la inmunización de ratones con Ad5-WEEV una semana antes de la exposición es suficiente para proteger ratones contra infecciones causadas por cepas diferentes de WEEV (la FIG. 7 muestra tres cepas, a saber, 71V-1658, CBA87 y Fleming). Este resultado sugiere que Ad5-WEEV es capaz de inducir inmunidad protectora cruzada frente a diferentes especies de WEEV.

Los ejemplos siguientes tienen como objetivo describir adicionalmente la invención y no se pretende que limiten al ámbito de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

45 **Ejemplo 1 – Células y virus**

Se adquirieron tanto células 293 como Vero de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos; número de catálogo para células 293: CRL-1573; número de catálogo para células Vero: CCL-81). Se usaron las células 293 para generar, propagar y valorar los vectores Ad descritos en la presente invención. Se usaron las células Vero para la preparación de soluciones madre de WEEV y la detección de anticuerpos de neutralización de WEEV. Tanto las células 293 como las células Vero se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM con alta concentración de glucosa, L-glutamina; Invitrogen/GIBCO, Burlington, ON, Canadá) se suplementaron con suero de bovino fetal al 10 % (FBS; HyClone, Mississauga, ON, Canadá), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen/GIBCO) y antibióticos-antimicóticos (Invitrogen/GIBCO). Para propagar las células, se usó tripsina-EDTA (tripsina al 0,05 %, EDTA-4Na; Invitrogen/GIBCO) para separar células adherentes del matraz. La suspensión de células individuales se diluyó a una relación 1:5 con medio nuevo y se sembró en matraces nuevos. Además, se estableció un banco de células de células 293 congelando un paso temprano (paso 4) de células a 1 x 10⁶ células/ml en D-MEM que contenía FBS al 40 %, dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %, piruvato de sodio al 1 mM y antibióticos-antimicóticos. Se usaron células 293 dentro de 30 pasos.

La cepa 71V-1658 de WEEV contenida en suspensión de cerebro de ratón lactante al 10 % se proveyó por parte de Nick Karabatsos (CDC, Fort Collins, CO). Las cepas CBA87 se proporcionaron amablemente por Dr George Ludwig (Instituto de Investigación Médica sobre Enfermedades Infecciosas del Ejército de los Estados Unidos, Frederick, MD, Estados Unidos). La cepa Fleming se adquirió de ATCC. Las soluciones madre de gérmenes de WEEV se fabricaron mediante la inoculación de células Vero con la suspensión de cerebro de ratón a una multiplicidad de infección (MOI) inferior a 0,1. El sobrenadante de las células infectadas se recogió, se dividió en partes alícuotas y

se almacenó a -70 °C para su uso posterior en estudios de exposición en animales y el ensayo de neutralización por reducción de placas. Todos los experimentos con WEEV se realizaron en el laboratorio en contenedor al nivel biológico 3 en Investigación y Desarrollo para la Defensa de Canadá (DRDC) en Suffield de acuerdo con las directrices del Ministerio de la Salud de Canadá y la Agencia de Inspección Alimentaria de Canadá. El vector Ad 5 Ad5-EGFP que expresa EGFP se fabricó previamente y se usó como control.

Ejemplo 2 – Clonación del gen *IFN-α* en el genoma de *Ad5* y generación de *Ad5-mIFNα*

Se construyó el plásmido pAd5-mIFNα y se usó para generar vectores Ad5 que expresan IFN-α de ratón. El plásmido se fabricó mediante las etapas siguientes (FIG. 1). En primer lugar, el plásmido pORF-mIFNα (InvivoGen, San Diego, CA, Estados Unidos), que contenía IFN-α de ratón codificante del gen, se digirió con enzimas de restricción *Sna*BI y *Nhe*I. Después de la electroforesis de la muestra de ADN digerida en un gel de agarosa al 0,8 %, el fragmento de ADN de 736 pares de bases (pb) que contenía el gen IFNα se escindió del gel y se purificó mediante el kit de extracción del gel QIAquick (QIAGEN, Mississauga, ON, Canadá). El fragmento de ADN purificado se clonó después en los sitios *Sna*BI-*Nhe*I del vector plásmido pCI (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) proporcionando el plásmido pCI-mIFNα. Un fragmento de *Pvu*II-*Xho*I se aisló a partir de pCI-mIFNα y se ligó en el vector plásmido pVAX1 tratado con *Eco*RV-*Xho*I (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El plásmido resultante, pVAX1-mIFNα, se cortó con *Hind*III y *Xba*I y se clonó en los sitios compatibles del plásmido pShuttle-CMV (Qbiogene, Carlsbad, CA, Estados Unidos), generando el plásmido de transferencia pSCMV-mIFNα. Finalmente, el plásmido pSCMV-mIFNα digerido con *Pme*I se mezcló con el plásmido pAdEasy-1 (Qbiogene), que contenía un genoma Ad5 de longitud completa con delecciones en las regiones E1 y E3 y se cotransformó en la cepa de *E. coli* BJ5183 (Qbiogene) para producir el plásmido pAd5-mIFNα.

Para la generación de Ad5-mIFNα, 40 µg de ADN de plásmido de pAd5-mIFNα, purificado con el kit QIAGEN Plasmid Maxi (QIAGEN), se digirió con la enzima de restricción *Pac*I y se purificó mediante precipitación en etanol. Después, 8 µg del ADN digerido se incubaron con 60 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 20 min. Los complejos ADN-lipofectamina 2000 se añadieron gota a gota a células 293 sembradas en matraces T25 (Corning Inc., Corning, NY, Estados Unidos). El Ad5-mIFNα se generó mediante incubación de los matraces a 37 °C en una incubadora con CO₂. Después de la aparición del efecto citopático (CPE) que se definió por hinchamiento o contracción de células, la formación de células gigantes multinucleares (syncitios) y la disgregación de la monocapa de células, el Ad5-mIFNα se recogió y se liberó de las células mediante tres ciclos de congelación y descongelación en un total de 1 ml de D-MEM suplementado con suero de bovino fetal (FBS) definido al 2 %, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos-antimicóticos. Los lisados de células que contenían Ad5-mIFNα se almacenaron a -70 °C.

Para propagar Ad5-mIFNα, se sembraron células 293 en cinco matraces T150 (Corning Inc.) y a cada matraz se inoculó 100 µl de lisado de célula que contenía Ad5-mIFNα diluido en un total de 5 ml de D-MEM suplementado con FBS definido al 2 %, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos-antimicóticos. Después de 1 h de incubación a 37 °C, se añadieron 15 ml extra de D-MEM a cada matraz. Tanto el medio de cultivo celular como las células infectadas se recogieron cuando apareció un CPE completo en células infectadas. El Ad5-mIFNα se purificó mediante el kit de purificación de Adeno-X virus BD (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante o se purificó mediante centrifugación con gradiente doble de cloruro de cesio (CsCl). El Ad5-mIFNα purificado se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Las valoraciones del Ad5-mIFNα purificado se determinaron mediante el ensayo de dosis infecciosa en cultivo de tejido 50 (TCID₅₀) en células 293. Para determinar las valoraciones de Ad5-mIFNα, células 293 en D-MEM suplementadas con suero de bovino fetal definido al 2 %, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos-antimicóticos se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos Linbro (Flow Laboratories, Inc., McLean, Virginia, Estados Unidos) a una concentración de 10⁴ células por pocillo. Se realizó una serie de diluciones de 10 veces del Ad5-mIFNα purificado y se dispensaron a cada pocillo 100 µl de los virus diluidos. La placa se incubó a 37 °C durante 10 días en una incubadora con CO₂. El número de pocillos que mostró CPE se contó y se calculó la proporción de pocillos CPE por fila. Se determinó la TCID₅₀ usando la fórmula siguiente: $T = 10^{1+d(S-0.5)}$, d = Log10 de la dilución, S = la suma de proporciones en cada pocillo. Las valoraciones finales se convirtieron en ufp/ml multiplicando las valoraciones de TCID₅₀ por 0,7.

Se usó la PCR para verificar la presencia del gen IFNα de ratón en el genoma vírico de Ad5-mIFNα. Para realizar esto, se extrajo ADN vírico de Ad5-mIFNα purificado usando los kits DNeasy Tissue (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, un total de 200 µl de virus purificados, que contenían aproximadamente 10⁷ ufp de Ad5-mIFNα, se mezcló con 20 µl de proteinasa K y 200 µl de tampón AL. Después de la incubación a 56 °C durante 10 min, la muestra se mezcló con 200 µl de etanol puro y se cargó en una columna giratoria DNeasy. La columna se lavó secuencialmente con tampón AW1 y AW2 y el ADN de Ad5-mIFNα se eluyó de la columna con 100 µl de H₂O.

El ADN de Ad5-mIFNα purificado se usó como una plantilla para PCR. Los cebadores fueron el cebador en sentido directo JQW7 (5'-GGC TAG GCT CTG TGC TTT CC-3') y el cebador en sentido inverso JQW8 (5'-TCA CTC CTC CTT GCT CAA TC-3'). Estos cebadores se diseñaron en base a la secuencia de ADN de Ad5-mIFNα y se

sintetizaron por parte de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, Estados Unidos. La PCR se realizó mediante ADN polimerasa de PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) con 2 min de desnaturalización inicial a 95 °C, 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 70 °C. Se llevó a cabo una extensión final de 7 a 72 °C después de 30 ciclos de amplificación. Como control negativo se amplificó por PCR ADN vírico de Ad5-EGFP usando los mismos cebadores. Los productos de la PCR se separaron mediante gel de agarosa al 0,8 % y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Ejemplo 3 – Detección de IFN- α de ratón expresado por Ad5-mIFN α

Se llevó a cabo SDS-PAGE usando el sistema de gel NuPAGE Gel System (Invitrogen) para detectar IFN- α de ratón expresado por Ad5-mIFN α . Para preparar muestras para el SDS-PAGE, células 293 confluentes sembradas en placas de 6 pocillos se infectaron con Ad5-EGFP purificado o Ad5-mIFN α purificado a una MOI de 1 en un total de 1 ml de D-MEM suplementado con FBS definido al 2 %, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos-antimicóticos. Se incluyeron células 293 no infectadas como control negativo. A 48 h después de la infección, se recogieron sobrenadantes (total de 2 ml) de células infectadas y se concentraron a 250 μ l usando dispositivos de filtrado por centrifugación Amicon Ultra-15 (PL-10, 10,000 NMWL MILLIPORE). Un total de 30 μ l de los sobrenadantes concentrados se mezcló con 10 μ l de tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) que contenía el 5 % (V/V) de β -mercaptoetanol. La muestra se sometió a ebullición durante 5 min, se cargó en gel Bis Tris NuPAGE Novex al 12 % junto con patrón de proteína multicolorado MultiMark (Invitrogen) y se sometió a electroforesis a 200 V durante 1 h en tampón de proceso NuPAGE MOPS SDS. Las proteínas sometidas a electroforesis se visualizaron tiñendo con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen).

El IFN- α de ratón expresado por Ad5-mIFN α se confirmó posteriormente mediante inmunotransferencia (Western), que se llevó a cabo mediante el sistema de gel NuPAGE y el kit Western Breeze de Invitrogen. Para hacer esto, células 293 confluentes sembradas en placas de 6 pocillos se infectaron con Ad5-EGFP purificado o Ad5-mIFN α purificado a una MOI de 1 en un total de 500 μ l de D-MEM suplementado con FBS definido al 2 %, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos-antimicóticos. Se incluyeron células 293 no infectadas como control negativo. A 24 y 48 h después de la infección, se recogió el medio (total de 500 μ l) de cada pocillo. Un total de 22,5 μ l del medio recogido se mezcló con 7,5 μ l de tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) que contenía el 5 % (V/V) de β -mercaptoetanol. Como control positivo se mezclaron 10 μ l de IFN- α de ratón recombinante purificado, expresado a partir de *E. coli* (Calbiochem, Mississauga, Ontario, Canadá) también con tampón de muestra. Las muestras se sometieron a ebullición durante 5 min, se cargaron en gel Bis Tris NuPAGE Novex al 12 % junto con patrón de proteína multicolorado MultiMark (Invitrogen) y se sometieron a electroforesis a 200 V durante 1 h en tampón de proceso NuPAGE MOPS SDS. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Towbin, Staehelin y Gordon, 1979) a 30 V durante 2 h en tampón de transferencia NuPAGE suplementado con metanol al 10 % (V/V) usando un módulo XCell II Blot Module (Invitrogen). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con solución de bloqueo y después se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 h con anticuerpos policlonales IFN α de conejo (Calbiochem) diluido 1:500 en solución de bloqueo. La nitrocelulosa se enjuagó cuatro veces con tampón de lavado de anticuerpo y se incubó durante 30 min con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina de cabra anticonejo (Invitrogen). Las bandas de proteína se visualizaron mediante sustrato en fosfatasa alcalina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) y nitro azul tetrazolio (NBT) (Invitrogen).

Ejemplo 4 – Clonación del gen de proteína de la envoltura E3-E2-6K-E1 de la cepa de WEEV 71V-1658 en genoma de Ad5 y generación de Ad5-WEEV

El gen que codifica las proteínas de la envoltura de la cepa 71V-1658 de WEEV se ensambló en tres etapas (FIG. 2). En primer lugar, el gen que codifica la proteína de la envoltura E3-E2 se aisló por PCR. Para realizar esto, el plásmido pVHX-6 (Nagata y col., 2005) se usó como plantilla. Los cebadores para la PCR fueron el cebador en sentido directo JQW3 (5'-CAC CAT GTC ACT AGT TAC AGC GCT ATG CGT GC- 3') y el cebador en sentido inverso JQW5 (5' -TCA CTA AGC GTT GGT TGG CCG AAT GC- 3'). Estos dos cebadores se diseñaron en base a la secuencia de GenBank de 71V-1658 (número de acceso NC_003908, nt 8250-9698; Netolitzky y col., 2000). Un codón inicial ATG (subrayado) se incorporó al cebador en sentido directo (JQW3) y los codones de detención TCACAT (subrayados) se construyeron en el cebador en sentido inverso (JQW5). Además, se añadieron cuatro nucleótidos CACC (negrita) al extremo 5' del cebador en sentido directo JQW3 antes del codón de inicio ATG para facilitar la clonación direccional del fragmento de PCR en el vector TOPO. La PCR se realizó usando ADN polimerasa de PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) con 2 min de desnaturalización inicial a 95 °C, 25 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineamiento a 55 °C, así como 1 min de extensión a 70 °C. La extensión durante 7 min a 72 °C se añadió como etapa final. El fragmento de PCR se separó mediante gel de agarosa al 0,8 % y se purificó mediante el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN, Mississauga, ON, Canadá). El fragmento de PCR purificado se clonó en un vector plásmido linearizado pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) para producir plásmido pcD3-WEE-E3-E2. La secuencia de ADN que codifica E3-E2 se verificó mediante secuenciación de ADN con el sistema de análisis genético CEQ8000 (Beckman Coulter INC., Fullerton, CA, Estados Unidos).

En la segunda etapa del ensamblaje, un fragmento de 1,6 kb de *EcoRI-EcoRV*, que contenía la secuencia de ADN que codifica la mitad N-terminal de la proteína 6K-E1, se aisló del plásmido pVHX-6. El fragmento de ADN se clonó

en el plásmido pcD3-WEE-E3-E2 usando sitios de restricción compatibles. El plásmido resultante se denominó pcD3-EE157.

5 En la etapa final del ensamblaje del gen que codifica las proteínas de la envoltura de la cepa 71V-1658, el plásmido pVHX-6 se digirió con enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI* y se aisló un fragmento de ADN de 1,5 kb que codifica la mitad C-terminal de la proteína 6K-E1. Este fragmento de ADN se clonó después en los sitios *XhoI-XbaI* de plásmido pcD3-EE157 para generar pcD3-WEE-E3-E2-6K-E1 que contiene el gen que codifica la totalidad de la poliproteína E3-E2-6K-E1 de 71V-1658.

10 Para insertar el gen que codifica la E3-E2-6K-E1 de la cepa de WEEV 71V-1658 en el genoma de Ad5, se fabricó un plásmido de transferencia mediante ligado del fragmento de 3,3 kb de *HindIII-XbaI* aislado de pcD3-WEE-E3-E2-6K-E1 en los sitios *HindIII-XbaI* del vector plásmido pShuttle-CMV (Qbiogene, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El plásmido resultante, pSCMV-WEE-E3-E2-6K-E1, se linearizó con la enzima de restricción *PmeI* y se cotransformó con el plásmido pAdEasy-1 (Qbiogene) en la cepa de *E. coli* BJ5183 (Qbiogene) para generar pAd5-WEE-E3-E2-6K-E1. La generación, la amplificación, la purificación y la valoración de Ad5-WEEV se realizaron en procedimientos similares descritos en el ejemplo 2.

20 Para confirmar la presencia del gen que codifica E3-E2-6K-E1 en Ad5-WEEV, se usó la PCR para amplificar el gen E3-E2-6K-E1 a partir de ADN de Ad5-WEEV a partir de Ad5-WEEV purificado. Los cebadores usados para la PCR fueron el cebador en sentido directo S1 (5'-ACC ACG ACC ATG ACA TCA AG-3') y el cebador en sentido inverso JQW4 (5'-CCG CGC TCA GTC ATC TAC GTG TG-3'). Los cebadores se sintetizaron mediante Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, Estados Unidos). La PCR se realizó mediante ADN polimerasa de HotStarTaq (Qiagene, Mississauga, Ontario, Canadá) con una etapa de activación inicial de 15 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineación a 55 °C y 2 min de extensión a 72 °C. Se llevó a cabo una extensión final de 10 min a 72 °C después de 30 ciclos de amplificación. El fragmento de ADN obtenido por PCR se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio después de electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

Ejemplo 5 – Detección de proteínas de la envoltura E1 y E2 expresadas por Ad5-WEEV

30 La expresión de proteínas de la envoltura E1 y E2 por Ad5-WEEV se detectó mediante inmunotransferencia (Western) usando el sistema de gel NuPAGE y el kit Western Breeze de Invitrogen descrito en el ejemplo 3. Se infectaron células 293 cultivadas en matraces T25 con Ad5-WEEV purificado a una MOI de 1 en un total de 1 ml de D-MEM suplementado con FBS definido al 2 %, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos-antimicóticos. Se incluyeron células 293 infectadas con Mock y con Ad5-EGFP como controles negativos. A 24 h después de la infección, los aglomerados celulares de cada matraz infectado se recogieron y se resuspendieron en 400 µl de tampón de muestra 1X NuPAGE LDS que contenía el 5 % (V/V) de β-mercaptoetanol. Las muestras se sometieron a ebullición durante 5 min y se cargaron en gel Bis-Tris NuPAGE al 10 % junto con patrón de proteína multicolorado MultiMark (Invitrogen). Las muestras de proteína se sometieron a electroforesis a 200 V durante 1 h en tampón de proceso NuPAGE MOPS SDS. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 30 V durante 2 h en tampón de transferencia NuPAGE suplementado con metanol al 10 % (V/V) usando un módulo XCell II Blot Module (Invitrogen). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con solución de bloqueo y después se incubó con mAb 3F3 o mAb 11D2 a temperatura ambiente durante 1,5 h. El 3F3 y el 11D2 se produjeron previamente en nuestro laboratorio (Long y col., 2000b). Se obtuvo 3F3 frente a E2 de la cepa B11 de WEEV y se obtuvo 11D2 frente a E1 de B11. Estos mAb también reaccionan de forma cruzada con la E2 y la E1 de la cepa 71V-1658 de WEEV. La nitrocelulosa se enjuagó cuatro veces con tampón de lavado de anticuerpo y se incubó durante 30 min con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina de cabra antirratón (Invitrogen). Las bandas de proteína se visualizaron usando sustrato BCIP/NBT para fosfatasa alcalina (Invitrogen).

Ejemplo 6 – Detección de anticuerpos de neutralización de WEEV después de la administración de ratones con Ad5-WEEV

50 Se obtuvieron ratones BALB/c hembra (17-20 g) de la colonia de cría de DRDC-Suffield con las parejas de cría originales adquiridas de Charles River Canada (St. Constant, Quebec). El uso de los ratones se revisó y aprobó por El Comité de Cuidado de Animales de DRDC-Suffield y se siguieron las directrices del Concilio para el Cuidado de Animales Canadiense para el cuidado y los manejos de los ratones. Se dividieron veinticuatro ratones en 4 grupos de 6 ratones cada uno. A cada ratón se inyectó por vía intramuscular (IM) un total de 100 µl de preparaciones de vacuna en el músculo de la pantorrilla (50 µl en cada lado). Se diluyeron vectores Ad5 purificados con PBS. Se inmunizó cada ratón de un grupo de 1 de ratones con 10⁷ ufp de Ad5-WEEV y recibieron un refuerzo 4 semanas después de la misma dosis de Ad5-WEEV. Como controles, se inyectó a cada ratón del grupo 2 de ratones 10⁷ ufp de Ad5-EGFP y recibieron un refuerzo 4 semanas después de la misma dosis de Ad5-EGFP. Los ratones del grupo 3 se inmunizaron 3 veces (2 semanas después) con una vacuna de WEE muertos (Bartelloni y col., 1971). Se inyectó a cada ratón del grupo 4 100 µl de PBS. Se recogió sangre de la vena de la cola 1 semana antes de la inyección y 11 días después de la primera inyección y de la de refuerzo y se recogió en tubos de separación de suero (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Se obtuvieron sueros por centrifugación a 3.300 x g durante 2 min y se almacenaron a -20 °C.

Los sueros recogidos de los ratones se analizaron para determinar la presencia de los anticuerpos de neutralización contra la cepa 71V-1658 mediante el ensayo de neutralización por reducción de placas (PRN). Los sueros agrupados de cada grupo se inactivaron por calor a 56 °C durante 30 min. Los sueros diluidos dos veces se mezclaron con 71V-1658 y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min, seguido por la inoculación de la mezcla en células Vero sembradas en placas de 6 pocillos. Las valoraciones de neutralización se comunicaron como valores recíprocos de la dilución de suero más elevada que dio como resultado una reducción del 50 % en el número de placas (PRN₅₀) con respecto a las células Vero de control que se infectaron con 71V-1658 solo.

Ejemplo 7 – Protección rápida después de la exposición de ratones frente a la infección por WEE V después de la coadministración de Ad5-mIFN α y Ad5-WEEV

Se dividieron cuarenta ratones BALB/c hembra (17-20 g) en 5 grupos de 8 ratones cada uno. Todos los ratones se provocaron en primer lugar con la cepa Fleming de WEEV mediante inoculación por vía intranasal (IN). Para hacer esto, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal, por vía intraperitoneal). Cuando los animales estuvieron inconscientes, se cogieron cuidadosamente con las manos con la cara hacia arriba y se aplicó un total de $1,5 \times 10^3$ ufp del virus diluido en 50 μ l de PBS cuidadosamente con una micropipeta en las fosas nasales. El volumen aplicado se inhaló de forma natural en los pulmones.

A 6 h después de la provocación con Fleming, se inyectó IM a cada ratón en el músculo de la pantorrilla con un total de 50 μ l de vectores Ad5 purificados diluidos en PBS. Se administró a cada uno de los ratones del grupo 1 10^7 ufp de Ad5-EGFP. Se administró a cada uno de los ratones del grupo 2 10^7 ufp de Ad5-mIFN α . Se administró a cada uno de los ratones del grupo 3 10^7 ufp de Ad5-WEEV. Se administró a cada uno de los ratones del grupo 4 10^7 ufp de Ad5-mIFN α y 10^7 ufp de Ad5-WEEV. Como controles, se inyectó a cada uno de los ratones del grupo 5 PBS. Siguiendo la inyección, los ratones se examinaron diariamente durante 14 días para determinar los signos clínicos de infección. Se usó la escala de clasificación siguiente para registrar signos clínicos: 0, normal; 1, pelo ligeramente ondulado, muy activo, ningún signo visible de infección; 2, pelo muy ondulado, signos definitivos de infección, no como si estuviera activo, pero aún se mueve bastante; 3, pelo muy ondulado, postura encorvada, movilidad reducida; y 4, pelo muy ondulado, postura encorvada, poca o nula movilidad, respiración rápida. Los ratones clasificados en el punto 4 se consideraron enfermos terminales y se sacrificaron mediante dislocación cervical según las directrices del Concilio de Cuidado de Animales Canadiense.

Ejemplo 8 – Protección rápida antes de la exposición de ratones frente a la infección por WEEV después de la administración de Ad5-mIFN α o Ad5-WEEV o de ambos

Se dividieron cuarenta ratones BALB/c hembra (17-20 g) en 6 grupos de 8 ratones cada uno. Se inyectó a cada uno de los ratones de dos grupos por vía intramuscular (IM) o intranasal (IN) 10^7 ufp de Ad5-mIFN- α . A los grupos de control se les inyectó 10^7 ufp de Ad5-EGFP o PBS. A 48 h después de la inyección, todos los ratones se expusieron a la cepa 71 V-1658 de WEEV mediante inoculación intranasal (IN) tal como se detalla en el Ejemplo 7. Siguiendo la exposición, los ratones se examinaron diariamente durante 14 días para determinar signos clínicos de infección. En otra serie de experimentos, se dividieron ratones BALB/c en 5 grupos de 8 ratones cada uno. Se administró a cada ratón de tres grupos de ratones IM 10^7 ufp de Ad5-WEEV, o 10^7 ufp de Ad5-mIFN- α , o 10^7 ufp de Ad5-WEEV y 10^7 ufp de Ad5-mIFN- α . Como controles, se administró a cada ratón de 2 grupos de ratones 10^7 ufp de Ad5-EGFP o PBS. Una semana después de la inyección, los ratones se expusieron a la cepa 71V-1658 de WEEV. Se realizó un seguimiento de los signos clínicos de infección durante 14 días siguiendo a la exposición.

Ejemplo 9 – Protección rápida de ratones frente a diferentes cepas de WEEV después de la administración de Ad5-WEEV

Se dividieron setenta y dos ratones en 9 grupos de 8 ratones cada uno. Se administró a cada uno de los ratones de los grupos 1, 2 y 3 10^7 ufp de Ad5-WEEV. Como controles, se administró a cada uno de los grupos 4, 5 y 6 10^7 ufp de Ad5-EGFP y a cada uno de los grupos 7, 8 y 9 se administró PBS. A una semana después de la inyección, los ratones de los grupos 1, 4 y 7 se expusieron cada uno IN a $1,5 \times 10^3$ ufp de 71V-1658. Los grupos 2, 5 y 8 se expusieron cada uno IN con $1,5 \times 10^3$ ufp de la cepa Fleming. Cada uno de los grupos 3, 6 y 9 se expuso IN con $1,5 \times 10^3$ ufp de la cepa CBA87. Los ratones se examinaron diariamente durante 14 días para determinar los signos clínicos de infección.

De lo anterior puede observarse que pueden usarse vectores Ad inocuos para la administración de vacunas o IFN- α para la protección antes de la exposición y después de la exposición frente a encefalitis inducidas por alfavirus. Se demuestra que una inyección de dosis única de vectores Ad que expresan el gen que codifica IFN- α o las proteínas de la envoltura de alfavirus o ambos podría proteger ratones frente a una exposición mortal a los virus. La expresión mediada por el vector Ad de IFN- α puede durar más de un mes, superando de este modo el problema de una semivida corta de IFN- α . El IFN- α expresado a partir de vectores Ad aumenta la potencia de IFN- α , y evita la administración de múltiples inyecciones de IFN- α . Además, administrando los genes que codifican las proteínas víricas a las células, los vectores Ad desencadenan una respuesta inmunitaria rápida en animales. Debido a que este procedimiento imita muy bien la infección natural de virus, induce respuestas inmunitarias mejores que cuando se comparan vacunas convencionales inactivadas o de subunidades de proteínas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector vírico recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica interferón-alfa para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus en el que se inocula a dicho animal dicho vector vírico recombinante en una cantidad eficaz para conferir una respuesta protectora a dicho animal y en el que se inocula también a dicho animal una vacuna que comprende un vector vírico recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica las proteínas estructurales de alfavirus en una cantidad eficaz para conferir una respuesta protectora a dicho animal.
- 10 2. Vacuna que comprende un vector vírico recombinante que contiene tanto una secuencia de ADN que codifica interferón-alfa y una secuencia de ADN que codifica las proteínas estructurales de alfavirus para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus, en el que se inocula a dicho animal dicha vacuna en una cantidad eficaz para conferir una respuesta protectora a dicho animal.
- 15 3. Vector vírico recombinante según la reivindicación 1 para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus, o vacuna según la reivindicación 2 para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus, en el que dicho vector vírico es un vector de transferencia vírica seleccionado del grupo que consiste en vectores víricos derivados de adenovirus, virus adenoasociados, parvovirus, virus de vacuna, herpesvirus, poxvirus, poliovirus y retrovirus.
- 20 4. Vector vírico recombinante según la reivindicación 1 o 3, para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus o vacuna según la reivindicación 2 o 3, para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus para usar en un procedimiento en el que dicho animal susceptible se selecciona del grupo que consiste en ratones, equinos y seres humanos.
- 25 5. Vector vírico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4 para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus, o vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 4, para usar en un procedimiento de protección después de la exposición de un animal susceptible a la infección por alfavirus en el que dicho alfavirus es el virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV), oriental (EEEV) u occidental (WEEV).
- 30 35

Figura 1

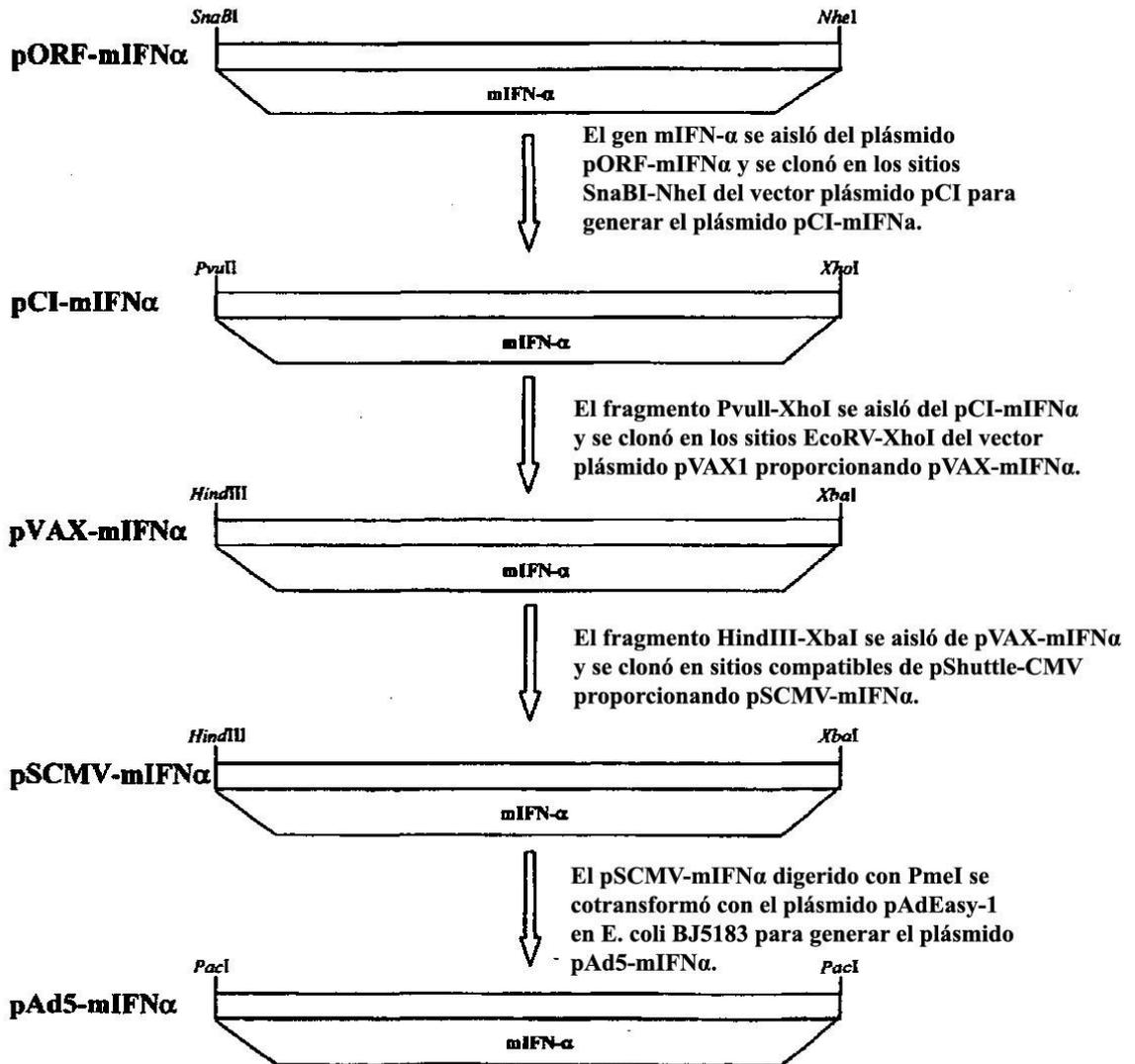


Figura 2

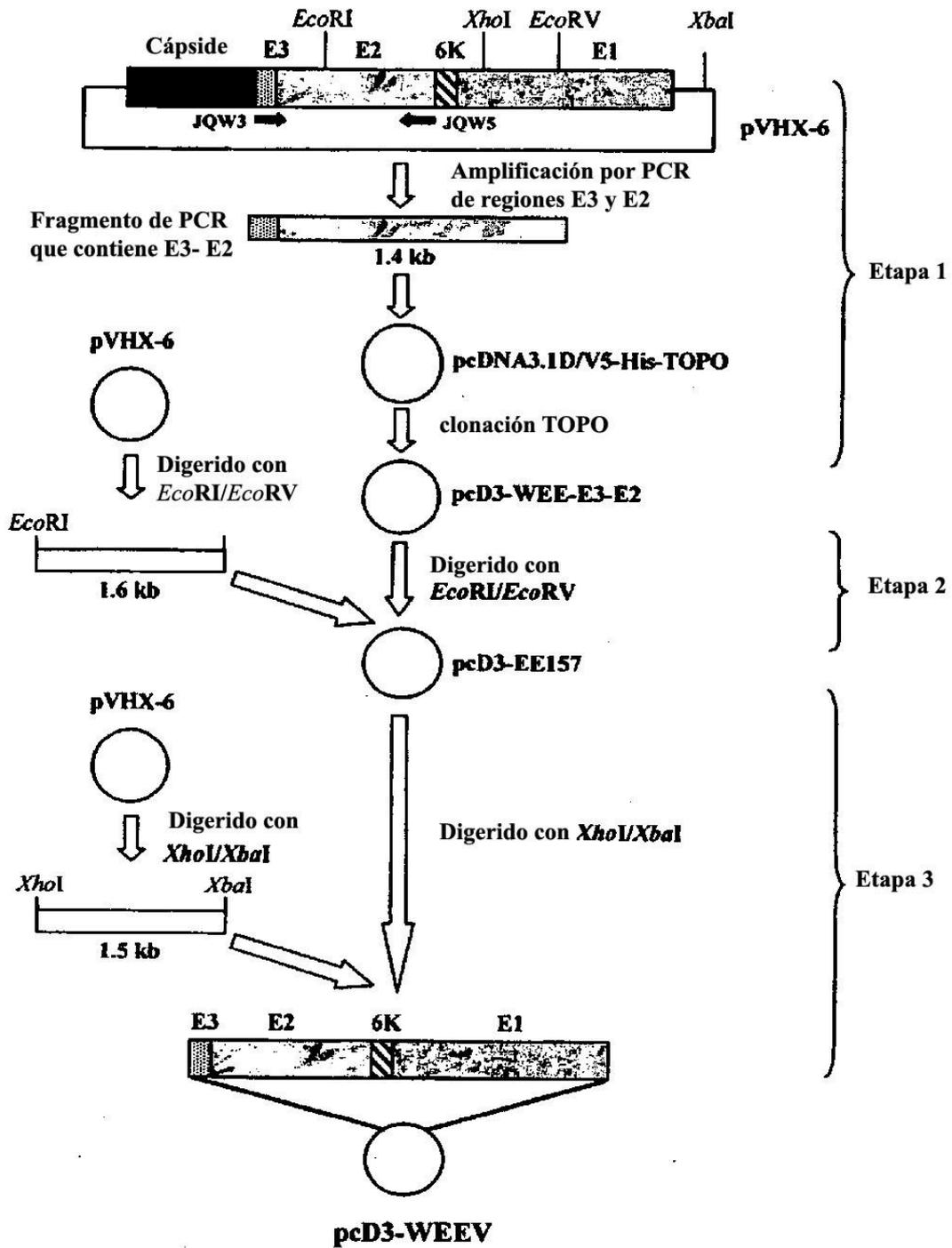
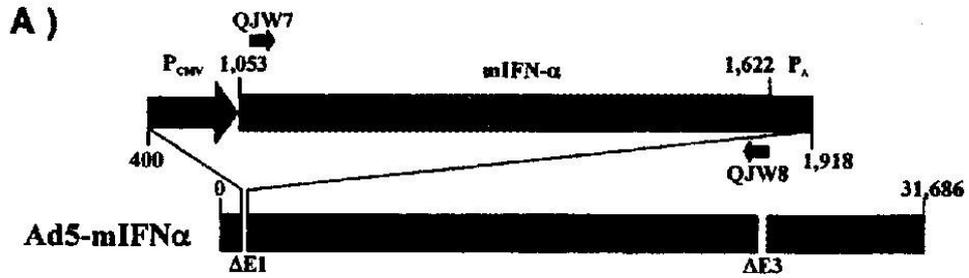
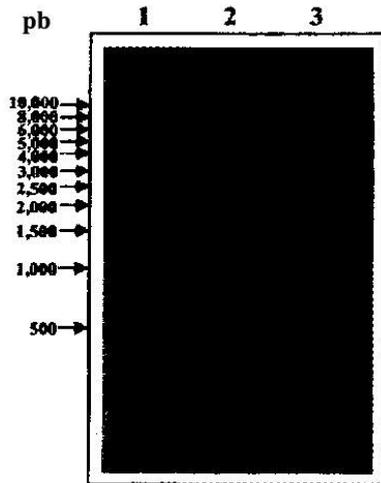


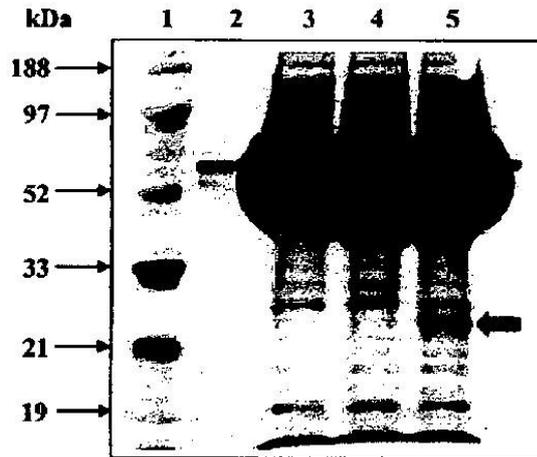
Figura 3



B)



C)



D)

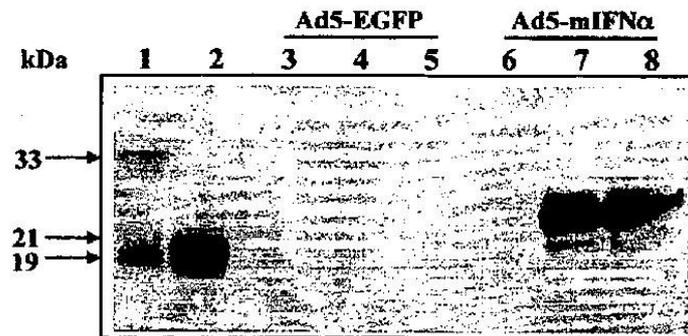


Figura 4

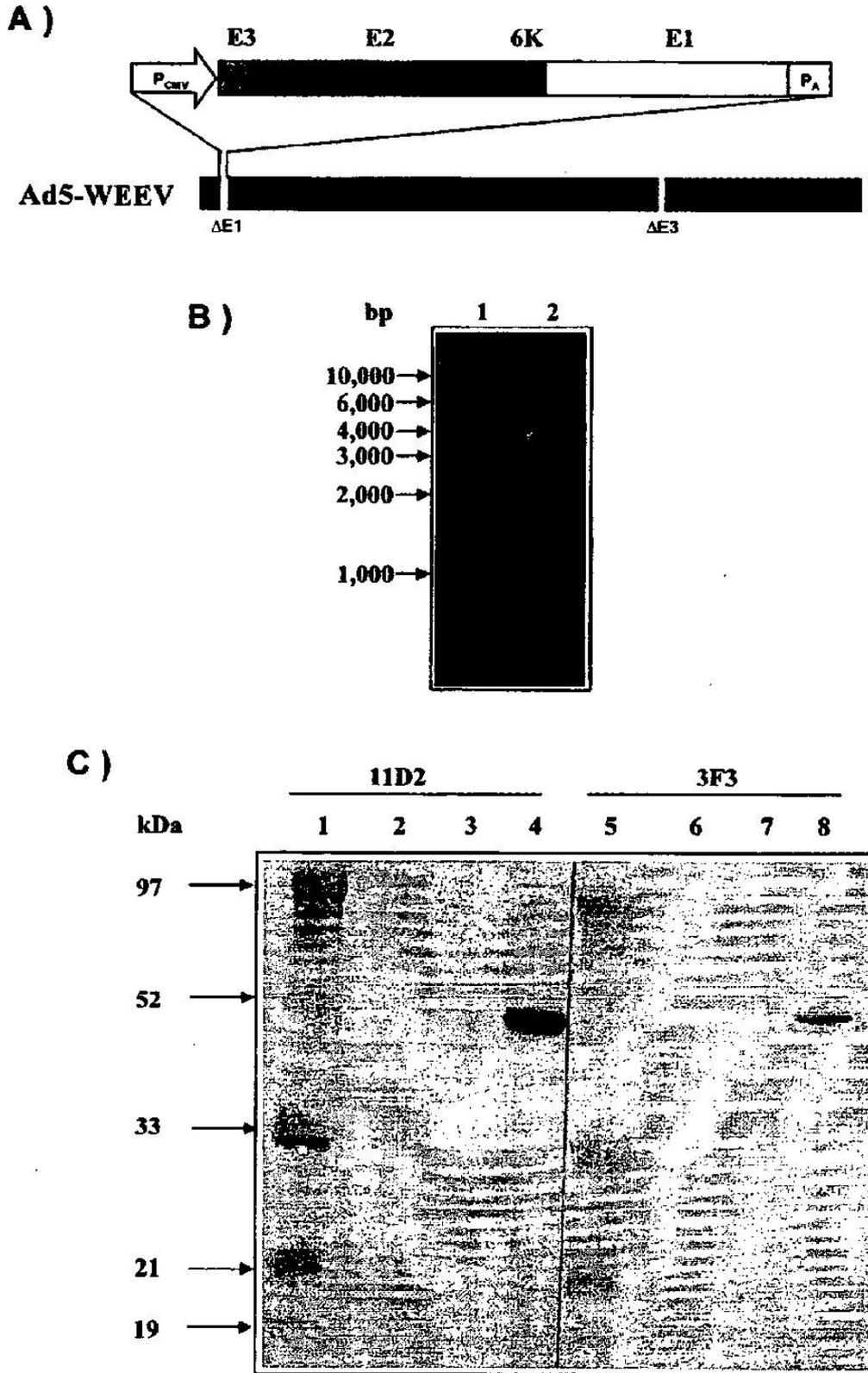


Figura 5

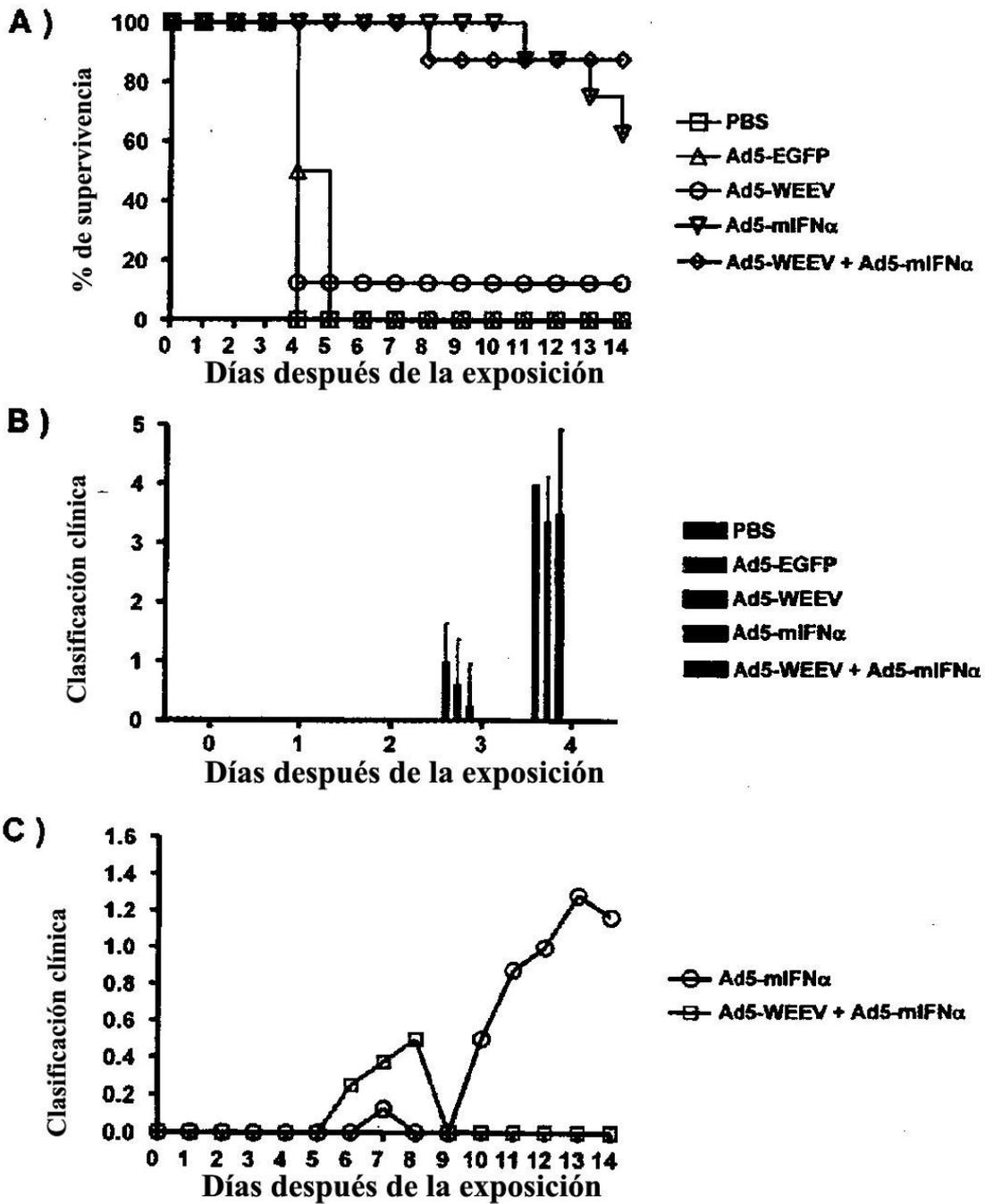


Figura 6

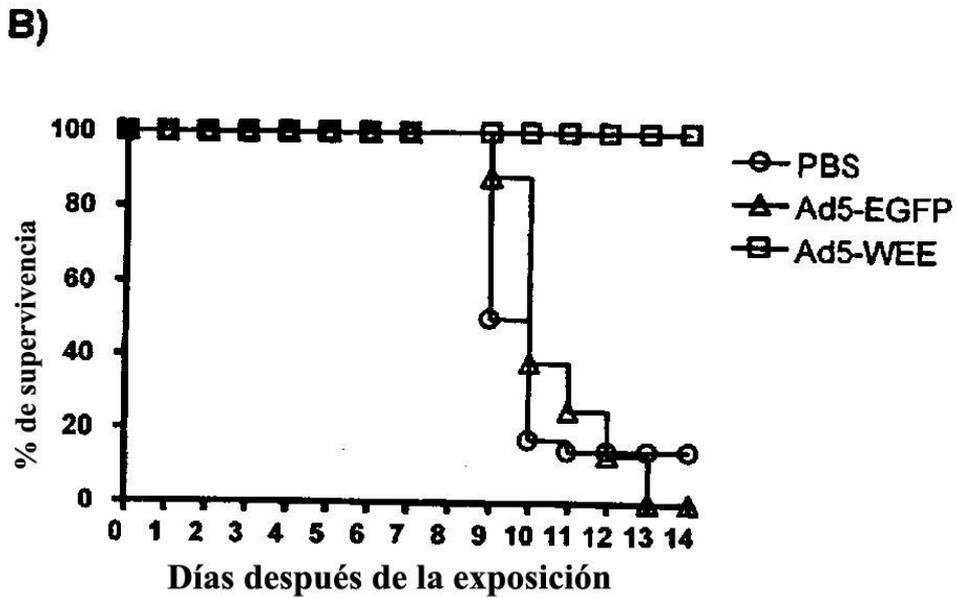
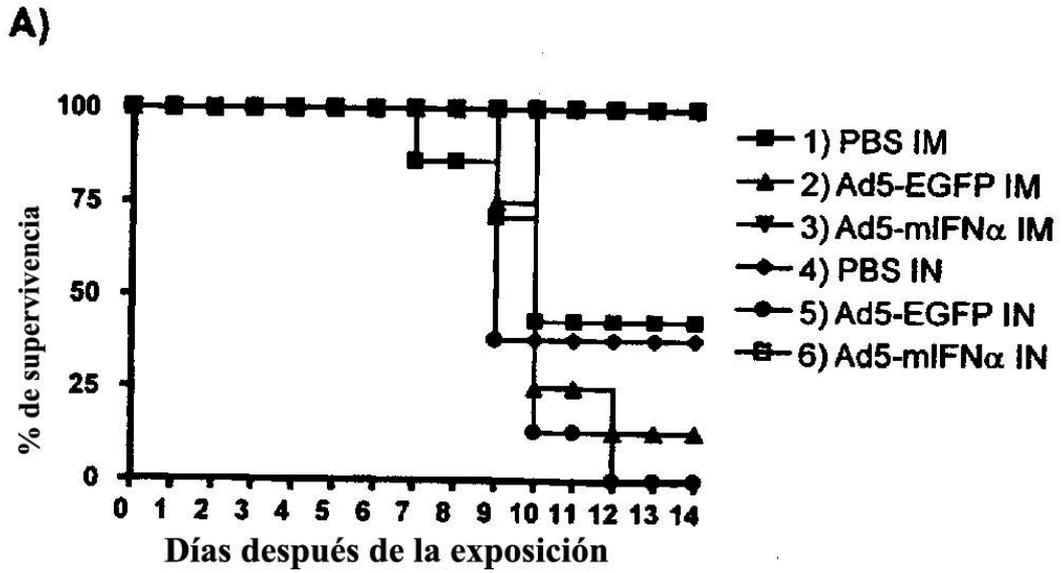


Figura 7

