

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 225**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (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: **27.04.2005 E 05816312 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1742657**

54 Título: **Régimen de inmunización con cebado de adenovirus suprimido en E4 y potenciación de adenovirus suprimido en E1**

30 Prioridad:

**28.04.2004 US 565892 P**

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

**10.02.2014**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (100.0%)**

**Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut  
Street, Suite 200 Philadelphia  
Pennsylvania 19104 , US**

72 Inventor/es:

**WILSON, JAMES M. y  
ZHI, YAN**

74 Agente/Representante:

**DE PABLOS RIBA, Julio**

**ES 2 442 225 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

Régimen de inmunización con cebado de adenovirus suprimido en E4 y potenciación de adenovirus suprimido en E1.

### 5 Antecedentes de la invención

10 Un 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 de transgén. Convencionalmente, los genes E1 de adenovirus son suprimidos y reemplazados por una casete de transgén consistente en el promotor de elección, la secuencia de cADN del gen de interés y una señal poli A, dando como resultado un virus recombinante de replicación defectuosa.

15 Los adenovirus tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica que consiste en tres proteínas principales, hexon (II), base penton (III) y una fibra nudosa, junto con un número de otras proteínas menores, VI, VII, IX, IIIa y Iva2 [W.C. Russell, J. Gen. Virol., 81, 2573-2604 (Nov. 2000)]. El genoma de virus es un ADN lineal, de doble cadena, con una proteína terminal sujeta covalentemente a los terminales 5', los cuales tienen repeticiones terminales invertidas (ITRs). El ADN del virus está asociado íntimamente a la proteína VII altamente básica y a un péptido pequeño denominado mu. Otra proteína, V, está empaquetada con este complejo de ADN-proteína y proporciona un enlace estructural para la cápside con la proteína Vi. El virus contiene también una proteasa codificada por el virus, la cual es necesaria para el procesamiento de algunas proteínas estructurales para producir virus infecciosos maduros.

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 suministrados a partir de dos adenovirus de chimpancé, el C1 y el C68 (denominados también Pan 9) y la solicitud de Patente Internacional núm. WO 02/33645 [Pan 5, Pan 6, Pan 7 – vectores derivados].

25 Lo que se necesita en el campo de las vacunas es un método de inmunización que pueda inducir una fuerte respuesta inmune a un objetivo con mínimas respuestas al portador de la vacuna.

### Sumario de la invención

30 Los métodos de la invención incluyen suministrar uno o más genes heterólogos seleccionados a un paciente mamífero mediante administración de un adenovirus suprimido en E1, E4, seguido de un adenovirus suprimido en E1. Adecuadamente, el segundo adenovirus administrado tiene una cápside que es diferente a la del adenovirus suministrado con anterioridad. Adecuadamente, el adenovirus potenciador contiene un producto que es el mismo que, o de reacción cruzada con, el suministrado por medio de la composición de cebado.

35 Sin estar sujetos a ninguna teoría, se considera que debido a que el primer vector carece de secuencias E4 de adenovirus, las cuales contienen epítopes CTL, se modula la respuesta inmune a la administración posterior de adenovirus. Por ello, el método de la invención proporciona un cebado de la respuesta inmune en el producto portado por los adenovirus, sin cebado concomitante de una respuesta inmune para el portador de adenovirus.

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

### Descripción detallada de la invención

40 En un aspecto, la invención proporciona un adenovirus de cebado suprimido en E1, suprimido en E4, para su uso en un régimen de vacuna con un adenovirus potenciador, en el que dicho adenovirus de cebado tiene una cápside y comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el producto de gen E3 del adenovirus, una región de adenovirus suprimida en E1, y una región de adenovirus suprimida en E4, reduciendo con ello una respuesta inmune al adenovirus de cebado a continuación de la administración del adenovirus de cebado a un sujeto, comprendiendo además dicho adenovirus de cebado una casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer producto que induce una respuesta inmune a un objetivo bajo el control de secuencias de control reguladoras que dirigen expresión del primer producto, y donde dicho adenovirus de cebado se destina a un uso en un régimen de vacuna junto con un adenovirus potenciador suprimido en E1 que expresa un segundo producto que es el mismo o que induce al objetivo a una respuesta inmune de reacción cruzada, en donde el adenovirus de cebado y el adenovirus potenciador tienen cápsides que son inmunológicamente distintas.

50 En un aspecto alternativo, la invención proporciona un adenovirus potenciador suprimido en E1, para su uso en un régimen de vacuna y un adenovirus de cebado, en donde dicho adenovirus potenciador tiene una cápside y comprende una región de adenovirus suprimida en E1 y una casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para inducir una respuesta inmune a un objetivo bajo el control

de secuencias de control reguladoras que dirigen expresión del producto, en donde el adenovirus potenciador está destinado a su uso en un régimen de vacuna junto con un adenovirus de cebado que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el producto de gen E3 de adenovirus, una región con E1 suprimido, y una región con E4 suprimido, reduciendo con ello una respuesta inmune al adenovirus de cebado a continuación de la administración del adenovirus de cebado a un sujeto, en donde dicho adenovirus de cebado expresa un producto que es el mismo o que induce una respuesta inmune de reacción cruzada al objetivo, en donde el adenovirus de cebado y el adenovirus potenciador tienen cápsides que son inmunológicamente distintas.

La invención proporciona también, según otro aspecto, un producto que comprende: (a) un adenovirus de cebado que tiene una primera cápside, comprendiendo dicho adenovirus una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el producto de gen E3 de adenovirus, una supresión en la región de E1, una supresión en la región de E4, reduciendo con ello una respuesta inmune al adenovirus a continuación de la administración del adenovirus de cebado a un sujeto, comprendiendo además dicho adenovirus una primera casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control reguladoras que dirigen expresión del producto en el sitio de la supresión de E1 y/o en la región con E4 suprimido; (b) un adenovirus potenciador que tiene una segunda cápside que es inmunológicamente distinta de la primera cápside, comprendiendo dicho adenovirus una supresión en la región E1, una segunda casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control reguladoras que dirigen expresión del producto en el sitio de la supresión de E1, en donde el segundo producto es el mismo o que induce una respuesta inmune de reacción cruzada en el objetivo; (c) un contenedor para los adenovirus de (a) y de (b); y (d) instrucciones para el uso del adenovirus de cebado (a) y del adenovirus potenciador (b), para su uso en la inmunización de un animal frente a un objetivo.

De ese modo, la invención hace posible un método de inducir específicamente una respuesta inmune celular y/o humoral administrando secuencialmente un adenovirus carente de una región funcional E1 y E4 y un adenovirus carente de una región funcional E1. Cada uno de los adenovirus contiene una 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 reguladoras que dirigen expresión del producto. Los productos portados por el adenovirus de cebado y por el adenovirus potenciador, pueden ser el mismo. Alternativamente, los productos portados por el adenovirus de cebado y por el adenovirus potenciador difieren, pero la respuesta inmune al producto del adenovirus potenciador es imprimida por el producto del adenovirus anterior.

En una realización, los productos codificados son los mismos, con el fin de proporcionar un efecto de cebado/potenciación al producto, lo que induce inmunidad al objetivo (por ejemplo, un patógeno causante de enfermedad) del que deriva el producto, o a un objetivo reactivo cruzado. En una realización, los elementos de control regulatorio y otros elementos del casete de expresión heteróloga difieren en el adenovirus administrado. Adecuadamente, el segundo adenovirus administrado tiene una cápside que difiere inmunológicamente del primer adenovirus administrado.

Según se utiliza en la presente memoria, un adenovirus que tiene una supresión funcional en la región E1 es de replicación defectuosa y es incapaz de expresar los productos de gen de esta región, incluyendo los productos de gen E1a y E1b.

El término "suprimido funcionalmente" o "supresión funcional" significa que se ha extraído o dañado 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 será más capaz de producir productos funcionales de expresión de gen. Si se desea, la región de gen completa puede ser retirada. Otros sitios adecuados para alteración o supresión de gen se discuten en otras partes de la solicitud.

De acuerdo con la presente invención, los adenovirus que contienen supresión en E4 están suprimidos funcionalmente respecto a una o más tramas de lectura abierta (ORFs) de E4 (por ejemplo, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7). En una realización, la construcción contiene una supresión funcional de cada una de las ORFs de E4. En otra realización, una combinación de una o más de estas ORFs está funcionalmente suprimida, y con preferencia, carece completamente de secuencias en la construcción adenoviral usada en el método de la invención.

En una realización, el régimen de combinación de la invención incluye la administración de un primer vector adenoviral que tiene una proteína de cápside de un primer serotipo y la administración posterior de al menos un vector adenoviral adicional que tiene una proteína de cápside que es inmunológicamente distinta del primer vector adenoviral, de cebado.

Según se utiliza en la presente memoria, una proteína de cápside es inmunológicamente distinta de otra proteína de cápside si la misma puede ser administrada a un sujeto a un nivel que permita una infección suficiente de las células anfitrión objetivo en ausencia de una respuesta inmune que impida la infección con la segunda proteína de cápside (por ejemplo, una respuesta de anticuerpo neutralizante de compensación). Adecuadamente, las proteínas de cápside del (de los) vector(es) adenoviral(es) potenciador(es) proceden de una fuente serológicamente distinta de la

5 proteína de cápside del (de los) vector(es) adenoviral(es) de cebado. Sin embargo, en otras realizaciones, las proteínas de cápside de los vectores adenovirales de cebado (y opcionalmente, de potenciación) pueden ser suministradas sin tener en cuenta la distintividad serológica, si los epítopes de anticuerpo de las proteínas de cápside están enmascarados, modificados, o neutralizados de otro modo (por ejemplo, por coadministración de una molécula exógena).

10 Por ejemplo, un vector derivado de un adenovirus de simio (por ejemplo, C5, C7 o C9) puede ser usado para cebar un vector de Ad5, o viceversa (es decir, un cebado de Ad5 para un potenciador de C5, C7 o C9). En otra realización, un vector derivado del serotipo C1 de adenovirus de chimpancés puede potenciar un cebado suministrado por un vector C5, C7 o C9 de simio, o viceversa (es decir, un cebado C1 seguido de un potenciamiento C5, C7 o C9). Incluso otras combinaciones de cebado-potenciación resultarán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

15 Sin pretender limitarse a la teoría, los inventores han encontrado que la retirada de genes tempranos adenovirales desde un administrador de cebado de un vector adenoviral, seguido de una administración potenciadora de un segundo vector adenoviral, ayuda a reducir o a eliminar la respuesta inmune del vector. Adecuadamente, el vector suministrado en la etapa de cebado carece de la capacidad para expresar los productos ORF de E4 adenoviral. En otras realizaciones, el vector de cebado carece además de la capacidad para expresar los productos E1a adenovirales, los productos de gen E2a y los productos de gen E2b. Normalmente, la eliminación de E3 resulta deseable para permitir la inserción de una casete de expresión. Sin embargo, se estima que E3 está implicado en la modulación de la respuesta inmune del anfitrión al adenovirus, y por lo tanto, puede ser conservado. En otra realización, el producto de gen E3 se expresa bajo el control de un promotor heterólogo, para evitar la regulación descendente del promotor natural de E3 que requiere expresión de E1.

## I. Vectores adenovirales

### A. Serotipos

25 Adecuadamente, estos vectores adenovirales de la invención contienen uno o más elementos adenovirales derivados de un genoma adenoviral seleccionado. En una realización, los vectores contienen ITRs adenovirales de un serotipo seleccionado y 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 y del serotipo de cualquier otra secuencia adenoviral presente en el vector, no es una limitación de la presente invención. Se encuentra disponible una diversidad de cepas de adenovirus a partir de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, o disponible bajo petición a partir de una diversidad de fuentes comerciales e institucionales. Además, las secuencias de muchas de esas cepas están disponibles a partir de una diversidad de bases de datos incluyendo, por ejemplo, PubMed™ y GenBank™. Vectores de adenovirus homólogos preparados a partir de otros adenovirus de simio o humanos, han sido descritos en la literatura publicada [véase, por ejemplo, la Patente US núm. 5.240.846]. 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, 7, 12 y 40, e incluyendo además cualquiera de los tipos humanos identificados. Las secuencias de ADN de un número de tipos de adenovirus están disponibles a partir de la base de datos GenBank™, incluyendo el tipo Ad5 [GenBank Accession núm. M73260]. De forma similar, se pueden emplear también adenovirus que se sabe que infectan animales no humanos (por ejemplo, simios) en las construcciones de vector de esta invención. Véanse, por ejemplo, las secuencias identificadas en la presente memoria. Véase, por ejemplo, la Patente US núm. 6.083.716.

45 En una realización, al menos uno de los adenovirus usados en la invención se deriva de un primate no humano. Ejemplos de secuencias de primate no humano adecuadas incluyen adenovirus de simios, tal como Pan5 (también C5), Pan6 (también C6), Pan7 (también C7), SV1, SV25, SV39 [véase la Publicación de Patente Internacional núm. WO 02/33645], Pan9 (también C68) y C1 (Patente US núm. 6.083.716) y SA18 [Solicitud de Patente US núm. 10/465.302], y su homóloga internacional, WO 2005/001103.

Ejemplos de otros serotipos de adenovirus que pueden ser útiles en el método de la invención incluyen, por ejemplo, el serotipo 34 [WO 2004/4097016], el serotipo 24 [WO 2004/083418], y el serotipo 35 [EP 1054064].

50 La invención abarca además vectores adenovirales de adenovirus seudotipados, quiméricos e híbridos. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente US núm. 10/465.302 y su homóloga internacional WO 2005/001103. Véase también US 2005/032045; WO 2004/108755; US 2004/081637.

55 Un producto adenoviral de simio que tenga una cápside modificada, puede ser usado tanto para cebado como para potenciación. En una realización, la modificación en el adenovirus lo vuelve inmunológica y/o serológicamente distinto del serotipo de cápside parental. Por lo tanto, tal cápside modificada puede ser usada en un régimen con la cápside parental o en un régimen con otro tipo adenoviral. En otras realizaciones, la modificación en el adenovirus proporciona otra ventaja, por ejemplo, una inducción incrementada de respuesta inmune u objetivación de los tipos

de célula específicos. Se han descrito métodos de modificación de adenovirus. Véase, por ejemplo, TP Cripe, et al., *Cancer Res*, 61(7): 2953-60 (Abril de 2001) (modificaciones de nudo de fibra); SC Stevenson, et al., *J. Virol.*, 71(6): 4782-90 (proteína de fibra modificada); C. Volpers, et al., *J. Virol.*, 77(3): 2093-104 (Febrero de 2003); S. Worgal, et al., *J. Virol.*, 78(5): 2572-80 (Marzo de 2004) (la cápside modificada intensifica la infección de células dendríticas y las respuestas inmunes celulares específicas del transgén); M. Wang., et al., *Gynecol. Oncol.*, 96(2): 341-8 (Febrero de 2005).

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

### Elementos adenovirales

10 Las partículas o vectores adenovirales que se utilizan en la presente invención están compuestos por cápsides de proteína de adenovirus que tienen empaquetada en las mismas una casete de expresión que porta un producto para ser expresado en el anfitrión y suficientes elementos virales para permitir el suministro de la casete de expresión a una célula anfitrión infectada. De forma deseable, estos vectores adenovirales son de replicación defectuosa, evitando con ello la replicación en una célula anfitrión.

15 En una realización, estas partículas adenovirales contienen elementos cis adenovirales 5' y elementos cis adenovirales 3' en los terminales 5' y 3' del adenovirus, respectivamente. El extremo 5' del genoma adenoviral contiene los elementos cis 5' necesarios para empaquetamiento y replicación; es decir, las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 5' (que funciona como origen de replicación) y los dominios potenciadores de empaquetamiento 5' (que contienen secuencias necesarias para empaquetar genomas Ad lineales y elementos potenciadores para el promotor de E1). El extremo 3' del genoma adenoviral incluye los elementos cis 3' (incluyendo las ITRs) necesarios para el empaquetado y la encapsulación.

20 El vector adenoviral usado en la invención puede contener secuencias adenovirales adicionales, o puede estar al menos suprimido funcionalmente en una o más regiones de gen adenoviral. En una realización, un vector adenoviral usado en la invención contendrá la región E2 o una porción funcional de la misma (por ejemplo, la región que codifica E2a y/o E2b), y uno o más de los genes finales, por ejemplo L1, L2, L3, L4 y L5. En algunas realizaciones, los vectores de adenovirus de la invención pueden contener toda, o una parte de, la región E4 (por ejemplo, la ORF6 de E4).

25 Por ejemplo, todo o una parte del gen E3 precoz retardado de adenovirus puede ser eliminada de la secuencia de adenovirus de simio que forma parte del vector viral. La función de E3 de simio se considera irrelevante en cuanto a la función y producción de la partícula de virus recombinante.

30 Por ejemplo, un vector de Ad suprimido en E1, puede ser construido de modo que tenga una supresión de al menos la región ORF6 del gen E4, y más deseablemente debido a la redundancia en la función de esta región, la región E4. Otro vector más de la invención contiene una supresión en el gen E2a precoz retardado. Adecuadamente, estos vectores retienen los genes finales (es decir, L1, L2, L3, L4 y L5), y otros elementos esenciales para el empaquetamiento de vectores adenovirales en partículas virales. Las supresiones pueden hacerse también en los genes IX e IVa<sub>2</sub> intermedios para algunos propósitos. Se pueden hacer otras supresiones en los otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Las supresiones mencionadas con anterioridad pueden ser usadas individualmente, es decir, una secuencia de adenovirus para su uso en la presente invención puede contener supresiones en una sola región. Alternativamente, supresiones de genes completos o de porciones de los mismos, efectivas para destruir su actividad biológica, pueden ser usadas según cualquier combinación. Por ejemplo, en un ejemplo de vector, la secuencia de adenovirus puede tener supresiones de los genes E1 y de una o más de las ORFs de E4, o de los genes E1, con o sin supresión de E3, y así sucesivamente.

### Elementos de vector

35 Los métodos empleados para la selección del antígeno o inmunógeno (es decir, el producto) y las secuencias que codifican el mismo, la clonación y la construcción de la "casete de expresión heteróloga" y su inserción en el vector viral, caen dentro del alcance del experto en la materia dadas las enseñanzas que se proporcionan en la presente memoria. De acuerdo con la presente invención, la casete de expresión heteróloga puede estar situada en el sitio de cualquier región adenoviral natural que esté situada entre las ITRs 5'y 3' del adenovirus. En una realización, la casete de expresión heteróloga está situada en la región natural de E1 del vector adenoviral. En otra realización, la casete de expresión heteróloga está situada en la región natural de E3. En otras realizaciones, el producto de gen está expresado a partir de la región E1 del vector adenoviral, o a partir de la región E3 natural del vector adenoviral, y está enlazado operativamente a elementos de control regulatorio que son no contiguos con las secuencias que codifican el producto de gen.

40 En otra realización más, el vector adenoviral porta más de una casete de expresión heteróloga, pudiendo ser insertadas en múltiples sitios de supresión en el genoma adenoviral. Esta invención no está limitada por la dirección en la que se inserta la casete de expresión, la cual puede ser 5'-3' ó 3'-5', en relación a la trama normal de lectura del genoma adenoviral que flanquea el sitio de inserción de la casete de expresión.

### 1. La secuencia de ácido nucleico

La casete de expresión contiene una secuencia de ácido nucleico, heteróloga en cuanto a las secuencias de vector que flanquean la secuencia, que codifica un polipéptido, una proteína u otro producto de interés. Adecuadamente, este producto es un inmunógeno o un antígeno. El ácido nucleico que codifica la secuencia está enlazado operativamente a componentes regulatorios de una manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión del producto en una célula anfitrión. Las secuencias y los productos de ácido nucleico adecuados pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia. La selección de estos elementos no es una limitación de la presente invención. Opcionalmente, cualquiera de las secuencias de codificación de ácido nucleico descritas en la presente memoria, puede estar dotada de una etiqueta o de otro marcador, que permita la detección de la secuencia (o producto codificado) a continuación de la infección del vector en células anfitrión. Los expertos en la materia son conocedores de etiquetas adecuadas y no constituyen una limitación de la presente invención.

### 2. Elementos regulatorios

Adicionalmente a los elementos principales identificados con anterioridad para la casete de expresión, el vector incluye también elementos de control convencionales que están enlazados operativamente a 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 usado en la invención. Según se utiliza en la presente memoria, secuencias "operativamente enlazadas" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas con el producto (por ejemplo, el gen) de interés, como secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar la expresión del producto.

Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de transcripción; señales de procesamiento eficiente de ARN tales como señales de empalme y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan mRNA citoplásmico; secuencias que incrementan la eficacia de traducción (es decir, secuencias de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que incrementan 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 del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) [véase por ejemplo Boshart et al., *Ce3ll*, 41: 521-530 (1985)], el promotor de SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de  $\beta$ -actina, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK), y el promotor de EF1 $\alpha$  [Invitrogen].

En otra realización, se podrá usar el promotor natural para el gen. Se puede preferir el promotor natural cuando se desee que la expresión del producto mimetice la expresión natural. El promotor natural puede ser usado cuando la expresión del producto de base sea regulada temporalmente o en el desarrollo, o de una manera específica del tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, otros elementos de expresión de control natural, tal como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak, pueden ser usados también para mimetizar la expresión natural.

Otra realización de la 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 usar un promotor que sea activo en el músculo esquelético. Esto incluye los promotores procedentes de genes que codifican la  $\beta$ -actina esquelética, la cadena 2A ligera de miosina, la distrofina, la creatina quinasa muscular, así como 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)). Ejemplos de promotores que son específicos del tejido son conocidos en relación con el hígado (albúmina, Miyatake et al., *J. Virol.*, 71: 5124-32 (1997); promotor troncal 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 inmunoglobulina; cadena receptora de célula T), neuronal tal como promotor de enolasa específica de la neurona (NSE) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13: 503-15 (1993)), gen de cadena ligera de neurofilamento (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, vectores portadores de secuencias que codifican productos inmunogénicos puede incluir también etiquetas o marcadores para permitir que un experto en la materia detecte la expresión de una diversidad de proteínas. La adición de estas etiquetas de epítipo en algunos casos obvian la necesidad de generar antisueros específicos para cada proteína individual.

Estos vectores son generados usando las técnicas y secuencias que se proporcionan en la presente memoria, junto con técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Tales técnicas incluyen técnicas de clonación convencional de ADN tal como las descritas en los textos [Sambrook et al., Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY], el uso de secuencias solapantes de oligonucleótido de los genomas de adenovirus, reacción de cadena de polimerasa, y cualquier método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótido deseada.

- 5 Según se ha expuesto con anterioridad, mientras que en una realización el régimen de inmunización de la invención incluye el suministro secuencial del mismo producto inmunogénico a través de diferentes vectores adenovirales, la casete de expresión usada en los vectores de cualquier régimen dado no necesitan ser iguales. De hecho, la casete de expresión puede contener secuencias regulatorias para el producto inmunogénico y/o elementos de vector diferentes. Por lo tanto, la selección de esos elementos regulatorios y de vector no es una limitación de la invención  
10 incluso dentro del contacto de un régimen de inmunización para un sujeto seleccionado.

#### **D. Producción de partículas adenovirales**

- Los expertos en la materia conocen una diversidad de métodos de producción para partículas adenovirales. La selección de métodos de producción adecuados 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, y la Solicitud de Patente  
15 US núm. 10/465.302. De forma resumida, un vector adenoviral que carezca de la capacidad de expresar cualesquiera productos de gen adenovirales esenciales (por ejemplo, E1a, E1b, E2a, E2b, ORF6 de E4) puede ser cultivado en presencia de productos de gen adenovirales faltantes que se requieran 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 auxiliares (por ejemplo, un plásmido o un virus) o de una  
20 célula anfitrión de empaquetamiento. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas para la preparación de un vector "minimal" de Ad humano en la Solicitud 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 de Ad minimales, o el genoma de Ad completo con supresiones solamente funcionales en las regiones de E1 y/o de E3, en una  
25 realización, el virus recombinante contiene una cápside derivada de un adenovirus de simio. Alternativamente, en otras realizaciones, los adenovirus seudotipados recombinantes pueden ser usados en los métodos de la invención. Tales adenovirus seudotipados utilizan proteínas de cápside de adenovirus en las que ha sido empaquetada una molécula de ácido nucleico portadora de secuencias de adenovirus procedentes de otro serotipo. Estos vectores adenovirales útiles en la invención pueden ser producidos usando métodos que son conocidos por los expertos en la  
30 materia.

##### **1. Virus auxiliares**

- Por lo tanto, dependiendo del contenido de gen de adenovirus de los vectores virales empleados para portar la casete de expresión, un adenovirus auxiliar o un fragmento de virus no replicante puede ser necesario para  
35 proporcionar suficientes secuencias de adenovirus de gen, necesarias para producir una partícula viral recombinante infecciosa que contenga la casete de expresión. 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 en la que es transfectado 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 con anterioridad. Tal virus auxiliar se utiliza deseablemente en combinación con una línea de células que expresan E1.

- 40 Los virus auxiliares pueden ser formados también en conjugados policlónicos según se describe en Wu et al., J. Biol. Chem., 264: 16985-16987 (1989); K. J. Fisher y J. M. Wilson, Biochem. J., 299: 49 (1 de Abril de 1994). El virus auxiliar puede contener opcionalmente una segunda casete de expresión informadora. En el estado de la técnica se conoce una cantidad de tales genes informadores. La presencia de un gen informador en el virus auxiliar que sea diferente del producto de gen en el vector de adenovirus, permite que tanto el vector de Ad como el virus auxiliar  
45 sean monitorizados independientemente. El segundo informador se utiliza para habilitar la separación entre el virus recombinante resultante y el virus auxiliar tras la purificación.

##### **2. Líneas de células de complementación**

- Para generar adenovirus (Ad) recombinantes en cualquiera de los genes descritos con anterioridad, la función de la región de gen suprimida, si es esencial para la replicación y la infectividad del virus, debe ser proporcionada al virus  
50 recombinante mediante un virus auxiliar o una línea de células, es decir, una línea de células de complementación o de empaquetamiento. En muchas circunstancias, se puede usar una línea de células que exprese el E1 humano para transcomplementar el vector de Ad de chimpancé. Esto es particularmente ventajoso puesto que, debido a la diversidad entre las secuencias de Ad de chimpancé de la invención y las secuencias de AdE1 humano encontradas en las células de empaquetamiento normalmente disponibles, el uso de las células que contienen E1 humano  
55 normal impide la generación de adenovirus competentes para replicación durante el proceso de replicación y producción. Sin embargo, en determinadas circunstancias, será deseable utilizar una línea de células que expresen los productos de gen E1 que pueden ser utilizados para la producción de un adenovirus de simio con E1 suprimido. Tales líneas de células han sido descritas. Véase, por ejemplo, la Patente US núm. 6.083.716.

Si se desea, se pueden utilizar las secuencias proporcionadas en la presente memoria para generar una célula de empaquetamiento o una línea celular que exprese, como mínimo, el gen E1 de adenovirus bajo el control transcripcional de un promotor para expresión en una línea celular parental seleccionada. Se pueden emplear promotores inducibles o constitutivos para este propósito. Ejemplos de tales promotores se describen con detalle en alguna parte de esta descripción. Se selecciona una célula parental para la generación de una nueva línea celular que exprese cualquier gen de Ad deseado. Sin limitación, tal línea celular parental puede ser derivada de células HeLa [ATCC Accession Núm. CCL 2], A549 [ATCC Accession núm. CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo, Detroit 510, CCL 72] y WI-38 [CCL 75], entre otras. Estas líneas celulares están todas disponibles a partir de la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas parentales adecuadas pueden ser obtenidas a partir de otras fuentes.

Tales líneas celulares de expresión de E1 son útiles en la generación de vectores con E1 suprimido de adenovirus recombinante. Adicionalmente, o alternativamente, la invención proporciona 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 construidas usando 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 suprimidos en los genes esenciales que codifican esos productos. La preparación de una célula anfitrión conforme a la presente invención, incluye técnicas tales como ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede ser llevado a cabo mediante técnicas de clonación directa [G. Gao et al., *Gene Ther.*, Octubre de 2003.; 10(22): 1926-1930; Publicación de Patente US núm. 2003-0092161-A, 15 de mayo de 2003; Solicitud de Patente Internacional núm. PCT/US03/12405]. Otras técnicas adecuadas incluyen clonación genómica y de cADN, lo que es bien conocido y ha sido descrito en Sambrook et al., citado anteriormente, el uso de secuencias solapantes de nucleótido de los genomas de adenovirus, combinadas con reacción de cadena de polimerasa, métodos sintéticos, y otros métodos adecuados que proporcionen la secuencia de nucleótido deseada.

En otra alternativa adicional, los productos de gen adenovirales esenciales se proporcionan en *trans* por medio del vector adenoviral y/o del virus auxiliar. En tal caso, una célula anfitrión adecuada puede ser seleccionada a partir de cualquier organismo biológico, incluyendo las células procarióticas (por ejemplo, bacterianas), y las células eucarióticas, incluyendo células de insectos, células de levadura y células de mamífero. Células anfitrión particularmente deseables son seleccionadas a partir de cualesquiera especies de mamíferos incluyendo, aunque sin limitación, células tales como A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, células HEK 293 o PERC6 ambas expresan E1 adenoviral funcional) (Fallaux, FJ et al., (1998), *Hum. Gene Ther.*, 9: 1909-1917], Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y células primarias de fibroblasto, hepatocito y mioblasto derivadas de mamíferos incluyendo el ser humano, el mono, el ratón, la rata, el conejo, y el hámster. La selección de la especie de mamífero que proporciona las células no es una limitación de la invención; ni tampoco lo es el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral, etc.

### **3. Ensamblaje de partícula viral y transfección de una línea de células**

En general, cuando se suministra el vector que comprende la casete de expresión mediante transfección, el vector es suministrado en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg de ADN, y con preferencia aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de ADN en aproximadamente  $1 \times 10^4$  células a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  células, y con preferencia en aproximadamente  $10^5$  células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN de vector para las células anfitrión pueden ser ajustadas teniendo en cuenta factores tales como el vector seleccionado, el método de suministro y las células anfitrión seleccionadas.

El vector puede ser cualquier vector conocido en el estado de la técnica o divulgado con anterioridad, incluyendo ADN desnudo, un plásmido, fago, transposon, cósmidos, episomas, virus, etc. La introducción en la célula anfitrión del vector se puede lograr mediante cualquier medio conocido en el estado de la técnica o divulgado con anterioridad, incluyendo transfección e infección. Uno o más de los genes adenovirales pueden ser integrados establemente en el genoma de la célula anfitrión, expresados establemente como episomas, o expresados transitoriamente. Los productos de gen pueden ser todos expresados transitoriamente, sobre un episoma, o estar 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 independientemente a partir de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenoviral natural. Los promotores pueden ser 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 añadidos exógenamente, por ejemplo.

La introducción de las moléculas (como plásmidos o virus) en la célula anfitrión puede ser también llevada a cabo usando técnicas conocidas por el experto en la materia y según se ha discutido a través de la descripción. En una realización preferida, se usan técnicas de transfección estándar, por ejemplo transfección de CaPO<sub>4</sub> o electroporación.

El ensamblaje de las secuencias de ADN seleccionadas de los adenovirus (así como el transgén y otros elementos

de vector en varios plásmidos intermedios, y el uso de los plásmidos y vectores para producir una partícula viral recombinante, se consiguen todos usando técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen clonación directa según ha sido descrito [G. Gao et al., *Gene Ther.*, Octubre de 2003; 10(22): 1926-1930; Publicación de Patente US núm. 2003-0092161-A, 15 de Mayo de 2003; Solicitud de Patente Internacional núm. PCT/US03/12405]. Alternativamente, técnicas de clonación de cADN tales como las descritas en los textos [Sambrook et al., citado en lo que antecede], el uso de secuencias solapantes de oligonucleótido de los genomas de adenovirus, reacción de cadena de polimerasa, y cualquier método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótido deseada. Se emplean técnicas de transfección y co-transfección estándar, por ejemplo técnicas de precipitación de CaPO<sub>4</sub>. Otros métodos convencionales empleados incluyen recombinación homóloga de los genomas virales, formación de placas de virus en capa de agar, métodos de generación de señal de medición, y similares.

Por ejemplo, a continuación de la construcción y ensamblaje del vector viral que contiene la casete de expresión deseada, el vector es transfectado *in vitro* en presencia de un virus auxiliar en la línea de células de empaquetamiento. La recombinación homóloga ocurre entre las secuencias auxiliar y de vector, lo que permite que las secuencias de transgén de adenovirus del vector sean replicadas y empaquetadas en cápsides de virión, dando como resultado las partículas de vector viral recombinante. El método normal para producir tales partículas de virus se basa en transfección. Sin embargo, la invención no se limita a tales métodos.

Los adenovirus recombinantes resultantes son útiles en la transferencia de un transgén seleccionado a una célula seleccionada.

## II. Formulación de vectores virales para inmunización

De acuerdo con la presente invención, se utilizan vectores recombinantes en el régimen de inmunización de la invención para inducir una respuesta inmune en un sujeto mamífero (por ejemplo, un humano, o un paciente veterinario simio o no simio) a continuación de la administración *ex vivo* o *in vivo*. En una realización, la respuesta inmune es una respuesta humoral (es decir, anticuerpo) al producto expresado por los vectores virales. Dependiendo del producto antígeno expresado, tal respuesta de anticuerpo puede ser específica para el patógeno a partir del cual se deriva el antígeno, o reactiva cruzada con otros patógenos relacionados. En una realización, la respuesta inmune puede ser una respuesta celular (por ejemplo, CTL). Dependiendo del producto inmunogénico expresado, tal respuesta CTL puede ser específica para el patógeno a partir del cual se deriva el inmunógeno o reactiva cruzada con otros patógenos relacionados. En otras realizaciones adicionales, ambas respuestas de anticuerpo y CTL pueden ser inducidas. Sin embargo, el método de la invención es ventajoso debido a que minimiza, y en algunos casos elimina, la respuesta inmune al vector viral, y en particular, al vector adenoviral.

Por lo tanto, los regímenes de inmunización de la invención pueden ser aplicados tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Tales composiciones de vacuna (u otras inmunogénicas) se formulan en un vehículo de suministro adecuado, según se ha descrito con anterioridad. En general, las dosis para las composiciones inmunogénicas están dentro de la gama definida con anterioridad para las composiciones terapéuticas. Los niveles de inmunidad del gen seleccionado pueden ser monitorizados para determinar la necesidad, si la hay, de potenciadores. Después de una evaluación de títulos de anticuerpo en el suero, pueden ser deseables inmunizaciones potenciadoras opcionales.

Opcionalmente, una composición de la invención puede ser formulada de modo que contenga vectores virales según se describe en la presente memoria, así como otros componentes, incluyendo por ejemplo adyuvantes, estabilizadores, ajustadores de pH, conservantes y similares. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen clorobutanol, sorbato potásico, ácido sórbico, dióxido de azufre, propil galato, los parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol y paraclorofenol.

Los estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina. Ejemplos adecuados de adyuvantes incluyen, entre otros, complejos inmuno-estimulantes (IS-COMS), análogos LPS que incluyen 3-O-desacilato monofosforil lípido A (Ribi Immunochem Research, Inc.; Hamilton, MT), aceite mineral y agua, hidróxido de aluminio, Amphigen, Avirdine, L121/escualeno, muramil péptidos, y saponinas, tal como Quil A, y cualquier factor biológicamente activo, tal como citoquina, una interleuquina, una quimiocina, un ligando, y combinaciones óptimas 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, un adyuvante de ese tipo puede ser administrado con un vector adenoviral de cebado.

Los vectores virales usados en la invención son administrados en "una cantidad inmunogénica", es decir, una cantidad de virus que sea efectiva en una ruta de administración para transfectar las células deseadas y proporcionar niveles de expresión suficientes del gen seleccionado para inducir una respuesta inmune. Donde se proporciona inmunidad protectora, se considera que los virus son composiciones de vacuna útiles en la prevención de infección y/o de enfermedad recurrente.

Alternativamente, o adicionalmente, los vectores usados en la invención pueden contener secuencias de ácido nucleico que codifiquen un producto (por ejemplo, un péptido, polipéptido o proteína) que induce una respuesta inmune a un inmunógeno seleccionado. Se espera que el régimen inmunogénico proporcionado en la presente memoria, sea altamente eficaz en cuanto a inducción de células T citolíticas y anticuerpos para la proteína

antigénica heteróloga insertada, expresada por el vector.

- Por ejemplo, se pueden seleccionar inmunógenos a partir de una diversidad de familias virales. Ejemplos de familias virales deseadas frente a las que podría ser deseable una respuesta inmune incluyen la familia picornavirus, la cual incluye los géneros rinovirus, los cuales son responsables de aproximadamente el 50% de los casos de resfriado común; los géneros enterovirus, los cuales incluyen los poliovirus, coxsackievirus, ecovirus, y enterovirus humanos tales como el virus de la hepatitis A; y los géneros aptovirus, los cuales son responsables de las enfermedades en el pie y en la boca, principalmente en animales no humanos. Dentro de la familia de virus de los picomavirus, los antígenos objetivo incluyen los VP1, VP2, VP3, VP4 y VPG. Otra familia viral incluye la familia calcivirus, la cual abarca del grupo de virus de Norwalk, los cuales son un importante agente causante de gastroenteritis epidémica.
- Otra familia viral adicional deseable para su uso en la objetivación de antígenos para inducir respuestas inmunes en humanos y animales no humanos, es la familia togavirus, la cual incluye los géneros alphavirus, los cuales incluyen el virus de Sindbis, el virus Ross River, y la encefalitis Venezolana, Eastern & Western Equina, y rubivirus, incluyendo el virus de la rubéola. La familia flaviviridae incluye los virus del dengue, la fiebre amarilla, la encefalitis japonesa, la encefalitis de St. Louis, y la encefalitis provocada por garrapatas.
- 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); US 2002/081568 (27 de Julio de 2002) o la familia coronavirus, la cual incluye un número de virus no humanos tal como el virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral), el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (cerdo), el virus de la encefalomielitis de hemaglutinina porcina (cerdo), el virus de la peritonitis infecciosa felina (gatos), el coronavirus entérico felino (gatos), el coronavirus canino (perros), y los coronavirus respiratorios humanos, los cuales pueden causar el resfriado común y/o hepatitis no-A, B o C. Adicionalmente, el agente causante putativo del síndrome respiratorio repentino agudo (SARS) se encuentra en la familia de los coronavirus. Dentro de la familia de los coronavirus, los antígenos objetivo incluyen el E1 (también conocido como proteína M o matriz), E2 (también denominado proteína S o de Spike), E3 (también conocido como HE o hemaglutina-elterosa), glicoproteína (no presente en todos los coronavirus), o N (nucleocápside). Otros antígenos adicionales pueden ser objetivados frente a la familia rhabdovirus, la cual incluye los géneros vesiculovirus (por ejemplo, el Virus de Estomatitis Vesicular), y los géneros lissavirus (por ejemplo, las rabias). Dentro de la familia rhabdovirus, se pueden extraer antígenos adecuados a partir de la proteína G o de la proteína N. La familia filoviridae, la cual incluye los virus de la fiebre hemorrágica tal como el virus Marburg y el Ebola, pueden ser una fuente adecuada de antígenos. La familia paramyxovirus incluye el virus de parainfluenza Tipo 1, el virus de parainfluenza Tipo 3, el virus de parainfluenza bovina Tipo 3, el rubulavirus (virus de las paperas), el virus de parainfluenza Tipo 2, el virus de parainfluenza Tipo 4, el virus de la enfermedad de Newcastle (polos), peste bovina, morbilivirus, el cual incluye sarampión y moquillo canino, y pneumovirus, el cual incluye el virus sincitial respiratorio U (por ejemplo, la proteína glico-(G) y la proteína de fusión (F). para las que se encuentran disponibles secuencias a partir de GenBank).
- El virus de parainfluenza está clasificado dentro de la familia orthomixovirus y es una fuente adecuada de antígeno (por ejemplo, la proteína HA, la proteína H1). La familia bunyavirus incluye los géneros bunyavirus (encefalitis California, La Crosse), flebovirus (Fiebre del Valle del Rift), hantavirus (el puremala es un virus de la fiebre hemahagin), nairovirus (enfermedad de la oveja de Nairobi) y varios bungavirus sin asignar. La familia arenavirus proporciona una fuente de antígenos con LCM y el virus de la fiebre de Lassa. La familia reovirus incluye los géneros reovirus, rotavirus (el cual causa gastroenteritis en niños), orbivirus, y cultivirus (fiebre de la garrapata de Colorado, Lebombo (humanos) encefalosis equina, lengua azul).
- La familia retrovirus incluye las subfamilia oncoviral que abarca enfermedades humanas y veterinarias tales como el virus de la leucemia felina, HTLVI y HTLVII, lentivirinal (que incluye el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la anemia infecciosa equina, y espumavirinal). Entre los lentivirus, se han descrito muchos antígenos adecuados y pueden ser seleccionados fácilmente.
- Ejemplos de antígenos adecuados de VIH y de VIS incluyen, sin limitación, las proteínas gag, pol, Vif, Vpx, VPR, Env, Tat, Nef y Rev, así como varios fragmentos de las mismas. Por ejemplo, fragmentos adecuados de la proteína Env pueden incluir cualquiera de sus subunidades tal como la gp 120, gp 140, gp 160, gp 41. O fragmentos más pequeños de las mismas, por ejemplo de al menos 8 aminoácidos de longitud. De manera similar, se pueden seleccionar fragmentos de la proteína tat. [Véase la Patente US núm. 5.891.994 y la Patente US núm. 6.193.981]. Véanse también las proteínas de VIH y VIS descritas por D.H. Bartouch et al., en J. Virol., 75(5): 2462-2467 (Marzo de 2001), y por R.R. Amara, et al., en Science, 292: 69-74 (6 de Abril de 2001). En otro ejemplo, se pueden usar proteínas inmunogénicas de VIH y de VIS o péptidos para formar proteínas de fusión u otras moléculas inmunogénicas. Véase, por ejemplo, las proteínas de fusión tat y/o Nef de VIH-1, y los regímenes de inmunización descritos en la Publicación de Patente Internacional núm. WO 01/54719, publicada el 2 de Agosto de 2001, Publicación de Patente Internacional núm. WO 99/16884, publicada el 8 de Abril de 1999; WO 03/11334; US 2003/158134. La invención no se limita a las proteínas inmunogénicas de VIH y de VIS o los péptidos que se describen en la presente memoria. Adicionalmente, se ha descrito una diversidad de modificaciones para estas proteínas o que podrían ser realizadas fácilmente por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, la proteína gag modificada que se ha descrito en la Patente US núm. 5.972.596. Además, cualesquiera inmunógenos deseados de VIH y/o de VIS pueden ser suministrados solos o en combinación. Tales combinaciones pueden incluir expresión a

partir de un único vector o de múltiples vectores. Opcionalmente, otras combinaciones pueden incluir el suministro de uno o más inmunógenos expresados con suministro de uno o más de los inmunógenos en forma de proteína. Tales combinaciones se discuten con mayor detalle en lo que sigue.

5 La familia papovavirus incluye la subfamilia poliomavirus (virus BKU y JCU) y la subfamilia papilomavirus (asociados con cánceres o progresión maligna de papiloma). Ejemplos de proteínas de papilomavirus útiles como productos inmunogénicos incluyen las derivadas de los genes "precoz" y "tardío" del virus del papiloma designados como E1 a E7 y L2. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente US Publicada núm. 2002/0137720 [Ert]. 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); Patente US núm. 6.342.224.

10 La familia adenovirus incluye virus (EX, AD7, ARD, O.B.) que causan enfermedad respiratoria y/o enteritis. El parvovirus felino de la familia parvovirus (enteritis felina), el panleucovirus felino, el parvovirus canino, y el parvovirus porcino. La familia herpesvirus incluye la subfamilia alfa herpesvirinae, la cual abarca los géneros simplexvirus (HSV1, HSVII), varicelovirus (pseudo-rabias, varicela zoster) y la subfamilia beta herpesvirinae, que incluye los géneros citomegalovirus (CMV Humano), muiromegalovirus y la subfamilia gamma herpesvirinae, la cual incluye los géneros linfocriptovirus, EBV (linfoma de Burkitts), rinotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, y rhadinovirus. La familia poxvirus incluye la subfamilia cordopoxvirinae, la cual abarca los géneros orthopoxvirus (Variola (Viruela) y Vaccinia (viruela bovina), parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, y la subfamilia entomopoxvirinae. La familia hepadnavirus incluye el virus de la Hepatitis B. Un virus no clasificado que puede ser una fuente adecuada de antígenos es el virus de la Hepatitis delta. Otras fuentes virales adicionales 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.

15 La presente invención puede abarcar también regímenes que utilizan productos que son útiles para inmunizar un humano o un animal no humano contra otros patógenos incluyendo las bacterias, los hongos, los microorganismos parásitos o los parásitos multicelulares que infectan a vertebrados humanos y no humanos, o procedentes de una célula cancerígena o de una célula tumoral. Ejemplos de patógenos bacterianos incluye los cocos patogénicos gran positivo incluyendo los pneumococos; estafilococos, y estreptococos. Los cocos patogénicos gran negativo incluye los meningococos; gonococos. Los bacilos entéricos patogénicos gran negativo incluyen las enterobacteriaceae; seudomonas, acinebacterias y eikenella; melioidosis, salmonella; shigella; hemófilos (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*); moraxella; *H ducreyi* (que ocasiona el cancroide); brucella; *Francisella tularensis* (que ocasiona tularemia); yersinia (pasteurella); estreptobacilo moniliformis y spirillum. Los bacilos gran positivo incluyen la listeria monocitogenes; erisipelotrix ruspithiae; *Corinebacterium diptheria* (difteria); cólera; *B. anthracis* (ántrax); donovanosis (granuloma inguinal); y bartonellosis. Las enfermedades causadas por bacterias anaeróbicas patógenas incluyen el tétanos; botulismo; otra clostridia; tuberculosis; lepra, y otras micobacterias.

20 Ejemplos de especies de bacterium específicas son, sin limitación, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diptheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, complejo intracelular *Mycobacterium*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumonia* y *Mycoplasma gallisepticum*.

25 Las enfermedades espiroquetales patogénicas incluyen sífilis, trepanomatosas: el pian, la pinta y la sífilis endémica; y leptoespirosis. Otras enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas más altas y hongos patogénicos incluyen actinomicosis; nocardiosis; criptococosis (*Cryptococcus*), blastomicosis (*Blastomyces*), histoplasmosis (*Histoplasma*) y cocodiyodomycosis (*Coccidioides*); candidiasis (*Candida*), aspergilosis (*Aspergillus*) y mucormicosis; esporotricosis; paracocodiyodomycosis, petrieldiosis, turolopsosis, micetoma y cromomicosis; y dermatofitosis. Las infecciones rickettsianas incluyen fiebre del tifus, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, fiebre Q, y viruela rickettsiana. Ejemplos de infecciones clamidiales y de micoplasma incluyen: *mycoplasma pneumoniae*; linfogranuloma venereum; psitacosis; e infecciones clamidiales perinatales. Los eucariotas patogénicos abarcan los protozoos y helmintos patogénicos y las infecciones producidas por los mismos incluyen: amebiasis; malaria; leishmaniasis (por ejemplo, causada 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 *Schistosoma*); nematodos; trematodos o platijas; e infecciones por cestodos (tenia). Otras enfermedades parásitas pueden estar causadas por *Ascaris*, *Trichuris*, *Cryptosporium* y *Pneumocystis carinii*, entre otros.

30 Muchos de esos organismos y/o toxinas producidas por los mismos, que 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, incluyen *Bacillus anthracis* (ántrax), *Clostridium botulinum* y su toxina (botulismo), *Yersinia pestis* (plaga), variola major (viruela), *Francisella tularensis* (tularemia), y fiebres

hemorrágicas virales [por ejemplo, Lassa, Machupol]], todas las cuales están actualmente clasificadas como agentes de Categoría A; *Coxiella burnetti* (fiebre Q); especies de *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (meloidosis), *Ricinus communis* y su toxina (toxina de ricino), *Clostridium perfringens* y su toxina (toxina épsilon), especies de *Staphylococcus* y sus toxinas (enterotoxina B), *Clamidia psittaci* (psitacosis), amenazas a la seguridad del agua (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*), fiebre del tifus (*Rickettsia powazekii*) y encefalitis viral (alfavirus, por ejemplo encefalitis equina Venezolana; encefalitis equina Eastern; encefalitis equina western); todas las cuales están actualmente clasificadas como agentes de categoría B; y virus Nipán y hantavirus, los cuales están actualmente clasificados como agentes de Categoría C. Además, otros organismos que están clasificados de ese modo o de una manera diferente, pueden ser identificados y/o usados para tal propósito en el futuro. Se comprenderá fácilmente que los vectores virales y otras construcciones descritas en la presente memoria son útiles para suministrar antígenos a partir de esos organismos, virus, sus toxinas y otros subproductos, que impedirán y/o tratarán la infección u otras reacciones adversas son esos agentes biológicos.

La administración de los vectores conforme a la invención para el suministro de inmunógenos contra la región variable de las células T induce una respuesta inmune que incluye linfocitos T (CTLs) citotóxicos para eliminar esas células T. En artritis reumatoide (RA), varias regiones variables específicas de receptores de células T (TCRs) que están involucradas en la enfermedad, han sido caracterizadas. Estos TCRs incluyen V-3, V-14, V-17 y V $\alpha$ -17. De ese modo, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de esos polipéptidos inducirá una respuesta inmune que objetivará células T involucradas en RA. En esclerosis múltiple (MS), varias regiones variables específicas de los TCRs que están involucradas en la enfermedad, han sido caracterizadas. Estos TCRs incluyen V-7 y V $\alpha$ -10. De ese modo, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de esos polipéptidos, inducirá una respuesta inmune que objetivará células T involucradas en MS. En escleroderma, varias regiones variables específicas de los TCRs que están involucradas en la enfermedad, han sido caracterizadas. Estos TCRs incluyen V-6, V-8, V-14 y V $\alpha$ -16, V $\alpha$ -3C, V $\alpha$ -7, V $\alpha$ -14, V $\alpha$ -15, V $\alpha$ -16, V $\alpha$ -28 y V $\alpha$ -12. De ese modo, el suministro de un adenovirus de simio recombinante que codifica al menos uno de esos polipéptidos, inducirá una respuesta inmune que objetivará células T involucradas en escleroderma.

Además, los inmunógenos deseables incluyen los dirigidos a inducir un efecto anti-cáncer terapéutico o profiláctico en un anfitrión vertebrado, tal como, sin limitación, los que utilizan un antígeno del cáncer o un antígeno asociado a tumor incluyendo, sin limitación, antígeno específico de la próstata, antígeno carcino-embriónico, MUC-1, Her2, CA-125 y MAGE-3.

Adecuadamente, los vectores adenovirales son suministrados en un régimen de combinación que incluye administración secuencial de un adenovirus suprimido en E1, E4 funcional y un adenovirus suprimido en E1 funcional. El régimen de la invención puede ser administrado en varios sitios del cuerpo de una manera dependiente de la dosis, que depende de la indicación a la que la respuesta inmune deseada esté siendo objetivada.

En una realización, la invención proporciona el uso de vectores adenovirales de la invención en la preparación de un medicamento para inducir específicamente una respuesta inmune en un sujeto. En otra realización los vectores se preparan para una administración secuencial.

La invención no se limita a la cantidad o al sitio de la(s) inyección(es) o al portador farmacéutico. El régimen incluye una etapa de cebado y una etapa de potenciación. Cada etapa puede incluir una única dosis o una dosificación o múltiples dosis que son administradas por hora, por día, semanalmente o mensualmente, o anualmente. La cantidad o el sitio de suministro se elige deseablemente en base a la identidad y a la condición del mamífero.

La unidad de dosificación del vector adecuado para el suministro del antígeno al mamífero se describe en la presente memoria. El vector se prepara para su administración siendo suspendido o disuelto en un portador farmacéutico o fisiológicamente aceptable tal como solución salina isotónica; solución de sales isotónicas u otras formulaciones que resultarán evidentes para el experto en tales administraciones. El portador apropiado será evidente para el experto en la materia y dependerá en gran medida de la ruta de administración. Las composiciones de la invención pueden ser administradas a un mamífero de acuerdo con la ruta descrita anteriormente, en una formulación de liberación sostenida usando un polímero biocompatible biodegradable, o mediante suministro in situ usando micelas, geles y liposomas. Opcionalmente, la etapa de cebado de esta invención incluye también la administración con la composición de cebado, de una cantidad adecuada de un adyuvante tal como se define en la presente memoria.

Con preferencia, se administra una segunda composición alrededor de 2 a alrededor de 27 semanas después de la administración de la primera, o de la administración precedente de una composición de inmunización, al sujeto mamífero. La administración de la composición de potenciación se realiza usando una cantidad efectiva de una composición de potenciación que contiene un producto que es el mismo que, o de reacción cruzada con, el suministrado por medio de la composición de cebado.

En otra realización, los vectores virales de la invención son también muy adecuados para su uso en una diversidad de otros regímenes de inmunización y terapéuticos. Tales usos resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

Las dosificaciones del vector viral dependerán principalmente de factores tales como la condición que va a ser tratada, la edad, el peso y el estado de salud del paciente, y puede por tanto variar entre pacientes mamíferos (incluyendo los seres humanos). Ventajosamente, la potencia inesperada del adenovirus de simio (por ejemplo, chimpancé) recombinante de la invención permite el uso de una cantidad significativamente más baja del adenovirus de chimpancé recombinante para proporcionar una cantidad efectiva que induzca el efecto inmunogénico deseado (por ejemplo, inducción de un nivel predeterminado de anticuerpos y/o de respuesta inmune citotóxica (CTL)).

Por ejemplo, para animales pequeños, una dosis efectiva de un vector adenoviral puede ser proporcionada mediante  $10^5$  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 seleccionar fácilmente dosis más altas, por ejemplo dependiendo de la vía de suministro seleccionada. Por ejemplo, el vector adenoviral puede ser suministrado en una cantidad comprendida en la gama de aproximadamente 100  $\mu$ l a aproximadamente 100 ml, y más preferentemente, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, de solución portadora. Los niveles terapéuticos, o niveles de inmunidad, del gen seleccionado, pueden ser monitorizados para determinar la necesidad, si la hay, de potenciadores. A continuación de una evaluación de respuesta de células T, o de títulos de anticuerpo, en el suero, pueden resultar deseables inmunizaciones potenciadoras adicionales opcionales.

En una realización, un régimen de inmunización según la invención incluye además la administración de una vacuna de ADN, por ejemplo a través de una pistola génica o de un plásmido. Tal vacuna de ADN puede ser usada como etapa de cebado, que antecede a un primer suministro mediado adenoviral de acuerdo con la invención. Alternativamente, tal vacuna de ADN puede ser usada como potenciación a continuación de una o más administraciones adenovirales de acuerdo con la invención.

En otra realización, el régimen incluye además una co-administración secuencial de una vacuna a base de proteína. Tal vacuna puede ser usada como potenciación, a continuación del suministro mediado adenoviral de acuerdo con la invención. Alternativamente, tal vacuna basada en proteína puede ser usada como cebado, o entre una o más inmunizaciones mediadas adenovirales en un régimen de la invención.

En un ejemplo, un régimen de inmunización de la invención proporciona una respuesta inmune protectora a un agente causante de enfermedad, por ejemplo un virus, una bacteria u otro organismo, o a un virus reactivo cruzado, una bacteria u otro agente causante de enfermedad. En otro ejemplo, el régimen de inmunización descrito en la presente memoria puede incluir un régimen multiproteína. Véase, por ejemplo, R.R. Amara, Science, 292: 69-74 (6 de Abril de 2001) que describe un régimen multiproteína para expresión de subunidades de proteína útiles para la generación de una respuesta inmune contra el VIH y el VIS.

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

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

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

Los ejemplos que siguen se proporcionan para ilustrar la invención y no limitan el alcance de la misma. Un experto en la materia podrá apreciar que aunque se describen reactivos y condiciones específicos en los ejemplos que siguen, se pueden realizar modificaciones que se entiende que están abarcadas por el alcance de la invención.

### **Ejemplo 1**

Se usó glicoproteína envolvente del virus Ebola Zaire (Ebo GP) como modelo de antígeno para crear un panel de vectores de vacuna C7, incluyendo el C7.000CMVGP con una región suprimida en E1, C7.010CMVGP con supresiones en ambas regiones E1 y E3, y C7.001CMVGP con supresiones en ambas regiones E1 y E4. La casete de expresión de transgén fue incorporada en las regiones E1 de esos vectores.

#### **A. Líneas de células**

Células A549 fueron mantenidas en un medio F-12K (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con antibiótico y con un 10% de FBS (Hyclone, Logan, UT). Células 293T fueron mantenidas en DMEM (Gibco-Life Technologies) suplementado con antibiótico y 10% de FBS (Hyclone).

#### **B. Plásmidos**

cADNs de longitud completa que codifican el virus Ebola (especie Zaire) VP40 o GP, fueron clonados por separado en un vector de expresión de mamífero, pcADN3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contenía el promotor CMV. Los

plásmidos resultantes fueron designados como pcDNAEboZVP40 y pcDNAEboZGP.

### **C. Expresión de EboZ GP a partir de células A549 transducidas**

5 Células A549 fueron transducidas con vectores adenovirales recombinantes (1.000 partículas por célula o 10.000 partículas por célula). Cuarenta y ocho horas después, las células fueron cultivadas directamente en solución  
 10 tampón de muestra Laemmli. Tras un calentamiento a 95 °C durante 5 minutos, se centrifugaron muestras de células y los sobrenadantes fueron cargados en gel de SDS-poliacrilamida. Tras electroforesis, las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa. La mancha fue visualizada mediante un sistema de manchado western ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), usando un anticuerpo policlonal para EboZ GP como anticuerpo primario a una dilución de 1:1.000 y anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como anticuerpo secundario a una dilución de 1:5.000.

### **D. Producción de partículas similares al virus EboZ (VLPs)**

15 Una mezcla de ADN libre de endotoxina, que contenía 45 µg de pcDNAEboZVP40 y 45 µg de pcDNAEboZGP, fue transfectada en cada placa de 150 mm de células 293T usando el Kit de Transfección de Mamífero CalPhos (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). El día siguiente, las células fueron cambiadas a un medio de cultivo fresco. Veinticuatro horas después, el medio fue cultivado y expandido tres veces a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante libre de células que contenía las VLPs, fue concentrado  
 20 adicionalmente mediante ultracentrifugación a 28.000 rpm mediante lecho de sacarosa al 20% durante 2 horas a 4 °C usando un rotor SW28 (Beckman, Fullerton, CA). Las VLPs concentradas fueron re-suspendidas a continuación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sobre hielo durante 5 horas y almacenadas a -80 °C en pequeñas porciones alícuotas.

### **E. Creación de clones moleculares de vectores de adenovirus que expresan EboZ**

25 Genomas de adenovirus recombinante que derivaban de diferentes especies y cepas de adenovirus y que expresan EboZGP, fueron creados mediante un sistema de ligación directa y de selección de verde/blanco que ha sido descrito en alguna parte (Gao et al., Gene Therapy, 10(22): 1926-1930 (Octubre de 2003) y Roy et al., Human Gene Therapy, 15(5): 519-530 (Mayo de 2004). De manera resumida, el cADN de EboZGP fue subclonado en un vector de plásmido pShuttle universal entre promotor de CMV y poliA de hormona de crecimiento bovina que fue usado para introducir el EboZGP en una diversidad de clones moleculares de las cadenas de adenovirus.

30 Los clones moleculares de las cadenas de adenovirus incluyen el serotipo 5 humano con supresiones E1 y E3 (H.5.040), el serotipo 7 de chimpancé con supresión E1 solamente (C7.000), supresiones E1 y E3 (C7.010) y supresiones E1 y E4 (C7.001). El proceso de clonación para crear esos clones moleculares ha sido descrito en alguna parte (Gao et al., Gene Therapy, 10(22): 1926-1930 (Octubre de 2003) y Roy et al., Human Gene Therapy, 15(5): 519-530 (Mayo de 2004)). Todos los clones moleculares que contenían una casete expresaron GFP procarionótico a partir del promotor lac bacteriano y flanqueado por dos sitios de restricción raros, PI-Sce e I-Ceu I.  
 35 Esto permitió a la casete de expresión EboZ de la construcción pShuttle universal ser permutada en los clones moleculares de adenovirus a través de un proceso de clonación mediado por selección verde/blanca conveniente y eficiente (Gao et al., 2003, citado anteriormente).

#### **1. Rescate, expansión y purificación de vectores de AdEboZ**

40 Para rescatar virus recombinantes de los clones moleculares, los ADNs de plásmido fueron linealizados mediante enzimas de restricción apropiadas para liberar los genomas de vector desde las cadenas principales del plásmido y ser transferidos a líneas celulares apropiadas. Para vectores suprimidos en E1/E4, se usó una línea celular de complementación de E1/E4 basada en células 293 con E4ORF6 expresada bajo inducción de zinc. Para todas las demás construcciones, se usaron células 293. Una vez completo el efecto citopático (CPE), se observó el signo de rescate del virus y de la replicación, se cultivó lisato viral crudo para su expansión gradual en infección a gran escala  
 45 en líneas celulares apropiadas. Los virus fueron purificados mediante el método de sedimentación de gradiente de CsCl estándar. Las estructuras de genoma de virus recombinantes fueron confirmadas mediante análisis de enzima de restricción. Para todo vector salvo para los vectores suprimidos en E1/E4, se determinó la infectividad de los virus mediante ensayo de placa sobre células 293. Sin embargo, los vectores utilizados para experimentos de inmunización fueron dosificados en base a cantidades de partículas físicas de virus medidas mediante lecturas OD260 en un espectrofotómetro de UV.  
 50

Mediante análisis de mancha western, los vectores C7.000CMVGP y C7.010CMVGP produjeron un nivel muy similar de expresión GP, mientras que el vector C7.001CWGP produjo significativamente menos proteína GP en células A549 transfectadas.

55 **Ejemplo 2 – Cebado de ratones con vector de Ad suprimido en E4 seguido de potenciación de vector de Ad suprimido en E1**

**A. Ratones**

5 Ratones B10BR (6-8 semanas de edad) fueron adquiridos en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y mantenidos en la Instalación Animal del Instituto Wistar (Filadelfia, PA). Los ratones fueron inmunizados con vectores adenovirales recombinantes o con vectores virales adenoasociados recombinantes diluidos en 100  $\mu$ l de PBS mediante inyección intramuscular.

**B. Péptido**

10 El péptido específico de EboZ GP restringido en H-2<sup>k</sup> (péptido TELRTFSI, SEQ ID núm. 1) que porta el epítipo inmunodominante MHC de clase I para ratones de haplotipo H-2<sup>k</sup>, fue sintetizado por Mimotopes (Victoria, Australia). El péptido fue diluido en DMSO a una concentración de 5 mg/ml y almacenado a -80 °C. El péptido fue usado a razón de 2  $\mu$ g/ml y las concentraciones de DMSO fueron mantenidas por debajo de un 0,1% (v/v) en todas las mezclas del ensayo final.

**C. Manchado IFN- $\gamma$  intracelular**

15 Esplenocitos procedentes de ratones inmunizados fueron estimulados con péptido TELRTFSI (SEQ ID núm. 1) durante 5 horas a 37 °C y 10% de CO<sub>2</sub> en presencia de 1  $\mu$ l/ml de Brefeldin A (GolgiPlug, BD PharMingen, San Diego, CA). Células de control fueron incubadas sin péptido. Tras un lavado, las células fueron manchadas con un anticuerpo CD8 anti-ratón etiquetado como FITC (BD PharMingen). A continuación, las células fueron lavadas y permeabilizadas en Cytotfix/Cytoperm (BD PharMingen) durante 20 minutos sobre hielo. Posteriormente, las células fueron lavadas de nuevo y manchadas con un anticuerpo IFN- $\gamma$  anti-ratón etiquetado como PE (BD PharMingen).  
20 Tras un intenso lavado, las células fueron examinadas mediante citometría de flujo bicolor y los datos fueron examinados mediante software de análisis de datos de citometría WinMDI™ [Microsoft]. Los esplenocitos incubados sin el péptido en el GP mostraron que <0,5% de células CD8+ T produjeron IFN-gamma.

**D. Medición de respuesta de IgG total en EboZ GP mediante ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA)**

25 Los ratones fueron sangrados ya sea mediante punción retro-orbital varias veces tras la inmunización, o ya sea por punción cardíaca a la terminación. Se prepararon sueros y se probaron en cuanto a respuesta IgG a EboZ GP en placas de 96 pocillos recubiertas con VLPs de EboZ diluidas en PBS. Las placas fueron recubiertas 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 contenían un 1% de BSA, fueron añadidos sobre los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un lavado, se añadió una dilución al 1:10.000 de IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió sustrato TBM (Sigma Chemicals) durante 10-20 minutos y la reacción fue detenida posteriormente por adición de Reactivo de Interrupción (Sigma Chemicals). La densidad óptica era roja a 450 nm. Se calculó un valor de corte para muestra positiva como el OD de delta medio a 450 nm para suero de control a una dilución de 1:100 más 3 veces de desviaciones estándar. El título de anticuerpo  
35 de punto final de cada muestra probada fue definido a continuación como la inversa de la dilución más alta del suero con una OD delta a 450 nm, que fue interpolada de acuerdo con el análisis de regresión lineal, por encima del valor de corte.

40 Mediante manchado de citoquina intracelular con péptido específico de GP restringido en H-2<sup>k</sup> como estimulante, se observaron frecuencias similares de células CD8+ T que produjeron IFN- $\gamma$  en ratones B10BR vacunados con C7.000CMVGP o C7.001CMVGP, mientras que se observaron frecuencias ligeramente más altas de células CD8+ T que producen IFN- $\gamma$  en ratones B10BR vacunados con C7.010CMVGP. Las respuestas totales de IgG al GP, medidas mediante ELISA, fueron equivalentes en suero procedente de ratones vacunados con cualquiera de esos vectores.

45 Los estudios en curso indican que se pueden conseguir mejores respuestas de célula B y de célula T específicas de GP cebando con C7.010CMVGP o bien con C7.001CMVGP y potenciando con H5CMVGP que cebando con C7.000CMVGP y potenciando con H5CMVGP.

Sobre todo, esos datos sugirieron que los vectores adenovirales multi-defectuosos son mejores portadores de vacuna.

50

**Listado de secuencias**

- <110> Los Fideocomisarios de la Universidad de Pennsylvania Wilson, James M. zhi, Yan
- <120> Régimen de Inmunización con Cebado de Adenovirus con E4 Suprimido y Potenciación de Adenovirus con E1 Suprimido
- 5 <130> UPN-Q3506PCT
- <150> US 60/565.892
- <151> 28-04-2004
- <160> 1
- <170> Patentin versión 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> Péptido específico de eboz GP restringido en H-2k
- <400> 1

20

25

30

35

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un adenovirus de cebado con E1 suprimido, con E4 suprimido, para su uso en un régimen de vacuna con un adenovirus de potenciación, en donde dicho adenovirus de cebado tiene una cápside y comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el producto de gen E3 de adenovirus, una región de adenovirus con E1 suprimido, y una región de adenovirus con E4 suprimido, reduciendo con ello una respuesta inmune al adenovirus de cebado a continuación de la administración del adenovirus de cebado a un sujeto, comprendiendo además dicho adenovirus de cebado una casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer producto que induce una respuesta inmune a un objetivo bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen expresión del primer producto, y donde dicho adenovirus de cebado está destinado a su uso en un régimen de vacuna junto con un adenovirus de potenciación con E1 suprimido que expresa un segundo producto que es el mismo o que induce una respuesta inmune reactiva cruzada al objetivo, en donde el adenovirus de cebado y el adenovirus de potenciación tienen cápsides que son inmunológicamente distintas.
- 10 2.- Un adenovirus de potenciación con E1 suprimido para su uso en un régimen de vacuna con un adenovirus de cebado, en donde dicho adenovirus de potenciación tiene una cápside y comprende una región de adenovirus con E1 suprimido y una casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para inducir una respuesta inmune a un objetivo bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen expresión del producto, en donde el adenovirus de potenciación está destinado a su uso en un régimen de vacuna junto con un adenovirus de cebado que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el producto de gen E3 de adenovirus, una región con E1 suprimido, y una región con E4 suprimido, reduciendo con ello una respuesta inmune al adenovirus de cebado a continuación de la administración del adenovirus de cebado a un sujeto, en donde dicho adenovirus de cebado expresa un producto que es el mismo o que induce una respuesta inmune reactiva cruzada al objetivo, en donde el adenovirus de cebado y el adenovirus de potenciación tienen cápsides que son inmunológicamente distintas.
- 15 3.- Un adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el producto del adenovirus de cebado y el producto de adenovirus de potenciación son los mismos.
- 20 4.- Un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el producto del adenovirus de cebado y el producto del adenovirus de potenciación inducen respuestas inmunes que son de reacción cruzada.
- 25 5.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las secuencias regulatorias para el producto son diferentes en el adenovirus que comprende la región suprimida en E1 y en E4, y en el adenovirus que comprende la región suprimida en E1.
- 30 6.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el adenovirus de cebado que comprende una región suprimida en E1 y E4, expresa el producto de gen E3 bajo el control de un promotor heterólogo.
- 35 7.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la casete de expresión del adenovirus de cebado que comprende una región suprimida en E1 y E4 y/o el adenovirus de potenciación que comprende la supresión de E1, está situada en la región con E1 suprimido.
- 40 8.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la casete de expresión del adenovirus de potenciación que comprende la supresión de E1 está situada en una región con E3 suprimido.
- 45 9.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cápside del adenovirus de cebado que comprende una región con E1 y E4 suprimidos o el adenovirus de potenciación que comprende la supresión de E1, se selecciona a partir de C5, C7 o C9.
- 10.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la cápside del adenovirus de cebado que comprende una región suprimida en E1 y E4 o la cápside del adenovirus de potenciación con E1 suprimido, se elige en el grupo consistente en Adhu5 y C1.
- 11.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el régimen de vacuna comprende además el uso de una vacuna de ADN.
- 50 12.- Un adenovirus de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha vacuna de ADN es para ser administrada con anterioridad a la administración del adenovirus de cebado que comprende una región con E1 y E4 suprimidos o del adenovirus de potenciación que comprende la región con E1 suprimido.
- 13.- Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el régimen de vacuna comprende además el uso de una vacuna a base de proteína.
- 14.- Un adenovirus de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha vacuna a base de proteína es para ser

suministrada después del adenovirus que comprende una región con E1 y E4 suprimidos y del adenovirus que comprende la región con E1 suprimido.

15.- Un producto que comprende:

5 (a) un adenovirus de cebado que tiene una primera cápside, comprendiendo dicho adenovirus una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el producto de gen E3 de adenovirus, una supresión en la región de E1, una supresión en la región de E4, reduciendo con ello una respuesta inmune al adenovirus a continuación de la administración del adenovirus de cebado a un sujeto, comprendiendo además dicho adenovirus una primera casete de expresión heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen expresión del producto en el sitio de supresión de E1 y/o en la región con E4 suprimido;

15 (b) un adenovirus de potenciación que tiene una segunda cápside que es inmunológicamente distinta de la primera cápside, comprendiendo dicho adenovirus una supresión en la región de E1, una segunda casete de expresión heteróloga que comprende secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo producto para inducir una respuesta inmune bajo el control de secuencias de control regulatorias que dirigen expresión del producto en el sitio de la supresión de E1, en donde el segundo producto es el mismo o que induce una respuesta inmune reactiva cruzada al objetivo;

(c) un contenedor para el adenovirus de (a) y de (b), y

(d) instrucciones para el uso del adenovirus de cebado (a) y del adenovirus de potenciación (b)

20 para su uso en la inmunización de un animal frente a un objetivo.

16.- El producto de acuerdo con la reivindicación 15, en donde las secuencias regulatorias para el primer producto y para el segundo producto son diferentes.

17.- El producto de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en donde el adenovirus de (as) expresa el producto de gen E3 bajo el control de un promotor heterólogo.

25 18.- El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde la casete de expresión de (a) y/o de (b) está situada en la región con E1 suprimido.

19.- El producto de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, en donde la casete de expresión (b) está situada en una región con E3 suprimido.

30 20.- El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde la primera cápside se selecciona en el grupo consistente en C5, C6 y C7.

21.- El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en donde la segunda cápside se selecciona en el grupo consistente en C68 y C1.

22.- El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, que comprende además una vacuna de ADN.

35 23.- El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, que comprende además una vacuna a base de proteína.

40

45