(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 520 968**

(51) Int. CI.:

A61K 39/015 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 10193968 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2363463**

(54) Título: **Nuevo vector baculovírico**

(30) Prioridad:

09.02.2006 JP 2006032863

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2014

(73) Titular/es:

EDUCATIONAL FOUNDATION JICHI MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)
3311-1, Yakushiji Shimotsuke-shi
Tochigi 329-0498, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

YOSHIDA, SHIGETO;
OHBA, YOSHIO;
HARIGUCHI, NORIMITSU;
MIZUKOSHI, MASAMI;
KAWASAKI, MASANORI;
MATSUMOTO, MAKOTO y
GOTO, YOSHIHIRO

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

Nuevo vector baculovírico.

Campo técnico

La presente invención se refiere a medicamentos (por ejemplo, vacunas, drogas terapéuticas o preventivas para enfermedades infecciosas, tales como malaria), que incluyen como principio activo el baculovirus recombinante.

Técnica anterior

El baculovirus se ha utilizado como vector para un procedimiento de producción industrial de una proteína objetivo, utilizando células de insectos. Recientemente, se encontró que los baculovirus pueden introducir un gen extraño, no sólo en las células de insectos, sino también en las de los mamíferos, habiéndose concebido la posibilidad de introducir en dicho vector un gen terapéutico. En el documento 1 de Patente, se da a conocer un vector de expresión del baculovirus recombinante, que posee múltiples promotores independientes, compuesto de una región de ADN que incluye un gen que codifica una proteína vírica no estructural en el promotor derivado de un gen temprano del baculovirus, y una región de ADN que incluye un gen que codifica una proteína vírica estructural en el promotor derivado de un gen tardío.

En el documento 2 de Patente, se da a conocer un procedimiento en el que un virus de un ADN de un no mamífero que incluye un promotor controlado, de forma que un gen exógeno es expresado a partir de un vector en el que los genes exógenos deseados se han unido a múltiples promotores independientes, se introduce en una célula y el gen exógeno se expresa en la célula de un mamífero.

Además, en el documento 3 de Patente, se da a conocer el procedimiento para obtener la proteína mediante tecnología recombinante, utilizando el baculovirus, y el procedimiento para obtener la proteína, expresando un gen de fusión obtenido uniendo un gen gp64 del baculovirus a un gen que codifica la proteína deseada, produciendo la proteína deseada de una forma en la que la proteína deseada se ha fusionado con las partículas víricas, recuperando las partículas víricas fusionadas con la proteína deseada, y fragmentando ésta a partir de ellas, para recuperar.

En el documento 4 de Patente, se da a conocer para un sistema de expresión de un baculovirus, un vector de expresión de un baculovirus recombinante que posee múltiples promotores independientes que incluyen una cebadora secuencia ácido nucleica que codifica un marcador de detección unido en una forma capaz de que funcione para un cebador promotor que es activo en una célula huésped, y es inactivo en una célula no aceptable, y una segunda secuencia ácido nucleica que comprende una secuencia ácido nucleica extraña unida de forma capaz de que funcione para un segundo promotor que es activo en una célula no aceptable.

En el documento 5 de Patente, se da a conocer que un vector baculovírico recombinante que expresa un antígeno hemaglutinínico (HA) del virus de la gripe, unido a un promotor CAG derivado de la β actina de pollos, es útil como formulación vacunal, porque el vector posee un efecto preventivo sobre la infección con el virus de la gripe.

En el documento 6 de la Patente, se da a conocer el procedimiento para producir un vector baculovírico que incluye una etapa de co-transfección en la que un plásmido en el que los genes que codifican proteínas capaces de expresarse en la superficie celular, se han unido al promotor baculovírico y al promotor derivado de la célula de mamífero, respectivamente, y un plásmido en el cual los genes que codifican proteínas capaz de expresarse en la superficie celular, se han unido a dos promotores baculovíricos, respectivamente, se cotransfectan, respectivamente en células de insectos.

Y en el documento 7 de Patente, se da a conocer un estudio sobre una actividad antivirus de la gripe, en la infección por este virus, utilizando el baculovirus recombinante, en el que el cADN del virus HA de la gripe se ha incorporado al promotor CAG, habiéndose mostrado que no sólo el baculovirus recombinante posee la actividad, sino que también la tiene el baculovirus de tipo salvaje.

Yoshida et al., Virology 316 (2003) 161-170, dan a conocer que los viriones del Baculovirus que muestran la proteína circunsporozoítica de *Plasmodium berghei*, protegen a los ratones contra la infección esporozoítica de la malaria.

De esta forma, recientemente, se han desarrollado varios baculovirus recombinantes, habiéndose estudiado, utilizando los baculovirus recombinantes como principios activos, el desarrollo farmacéutico en los mamíferos.

En la técnica relacionada, se ha tenido como finalidad, por una parte, un vector baculovírico recombinante que muestra una nueva estructura, y por otra representa el desarrollo de una formulación farmacéutica, particularmente una de tipo vacunal, que utilice el baculovirus recombinante como principio activo, que es efectivo para tratar enfermedades infecciosas como malaria y gripe, o patologías como el cáncer.

Documento 1 de la Patente: Patente Japonesa nº 3366328, sistema de expresión baculovírica de múltiples promotores y productos defecto en partículas.

Documento 2 de Patente: WO98/011243, virus ADN no mamífero con proteína de cubierta modificada.

Documento 3 de Patente: JP Nº 2002-235236-A, Procedimientos para obtener proteínas.

Documento 4 de Patente: JP Nº 2003-284557-A, nuevo vector vaculovírico de transfección y baculovirus recombinante para la expresión del gen extraño.

Documento 5 de Patente: WO02/062381, vacuna de vector baculovírico.

Documento 6 de Patente: WO04/029259, vector baculovírico, procedimiento para producir el vector baculovírico y procedimiento para introducir el gen.

Documento 7 de Patente: JP Nº 2005-15346-A Baculovirus que contiene un agente antivírico.

Exposición de la invención

Problemas a resolver por la invención

Se dan a conocer un nuevo vector recombinante de transferencia, un baculovirus recombinante obtenido mediante recombinación homóloga del vector recombinante de transferencia, y un ADN baculovírico, y procedimientos para su obtención. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un medicamento, particularmente una formulación vacunal, utilizando el baculovirus recombinante como principio activo.

Medios para resolver problemas

En el contexto de la presente invención un vector de transferencia que posee una nueva estructura, que puede expresar una proteína que posee una inmunogenicidad deseada, o una proteína de fusión de una proteína parcial, o la proteína que posee la inmunogenicidad, con citoquina, en células de insectos y vertebrados (particularmente mamíferos, aves y peces), células distintas a las de insectos, y un baculovirus recombinante obtenido mediante recombinación homóloga del vector de transferencia y del ADN baculovírico. Proporcionando el baculovirus recombinante se estudió extensamente el medicamento que lo incluye, como principio activo con efectos efectivos preventivos y/o terapéuticos sobre las enfermedades infecciosas. Como resultado, se ha descubierto en el contexto de la presente invención nuevamente que el baculovirus recombinante tiene el efecto del medicamento deseado.

Y, según esta exposición, el vector recombinante de transferencia que posee la nueva estructura, el baculovirus recombinante obtenido mediante recombinación homóloga del vector de transferencia y el ADN baculovírico, así como los procedimientos para su producción, se confirmaron, así como que el baculovirus recombinante en sí mismo demostró utilidad como medicamento capaz de expresar la proteína que posee la inmunogenicidad deseada en las células diana, y que se demostró útil como el medicamento preventivo para enfermedades infecciosas tales como malaria y gripe, cumpliéndose de este modo, aquí, la presente invención.

Se dan a conocer los siguientes “apartados” [1] a [31]:

(1) Procedimiento para obtener un vector de transferencia que comprende una estructura en la cual se han incorporado un promotor dual y un gen de fusión, caracterizado porque el gen de fusión que incluye por lo menos un gen que codifica una proteína capaz de constituir un componente de una partícula vírica y, de por lo menos, un gen inmunogénico extraño, se unen por debajo del promotor dual, uniendo un promotor de vertebrados y otro baculovírico.

(2) El procedimiento según el apartado (1), en el que el promotor de vertebrados es uno de mamíferos.

(3) El procedimiento según los apartados (1) ó (2), caracterizado por que el gen que codifica por lo menos una proteína que puede constituir un componente de la partícula vírica, es cualquiera de un gen gp64 del baculovirus, un gen de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, un gen de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I, un gen de la glicoproteína de membrana de un virus sincicial respiratorio humano, un gen de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe de tipo A, un gen de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe de tipo B, un gen de la glicoproteína del virus del herpes simplex, y un gen de la proteína S del virus de la hepatitis murina.

(4) El procedimiento según los apartados (1) o (2), en el que el promotor de vertebrados es seleccionado a partir de cualquiera de un promotor citomegalovírico, de un promotor SV40, de un promotor retrovírico, de un promotor metalotioneínico, de un promotor de la proteína de choque térmico, de un promotor CAG, de un promotor 1α del factor de elongación, de un promotor actínico, de un promotor de la ubiquitina, de un

promotor de la albúmina y de un promotor MHC de tipo II.

(5) El procedimiento de los apartados (1) a (4), en el que el promotor baculovírico se selecciona a partir de un promotor polihedrínico, un promotor p10, un promotor IE1, un promotor IE2, un promotor p35, un promotor p39, y un promotor gp64.

(6) El procedimiento según cualquiera de los apartados (1) a (5), en el que el gen extraño inmunogénico se selecciona a partir de un antígeno de la malaria, un antígeno de la gripe, un antígeno de *M. Tuberculosis*, un antígeno del virus SARS, un antígeno del virus de la fiebre del oeste del Nilo, un antígeno del virus de la fiebre del dengue, un antígeno de HIV, un antígeno del HCV, un antígeno de la leishimaniosis, un antígeno tripanosónicol un antígeno parásito de aves aislado, o un antígeno de fusión de, por lo menos, uno seleccionado a partir de estos grupos génicos antigénicos con una citoquina.

(7) El procedimiento según cualquiera de los apartados (1) a (6), en el que el vector de transferencia es cualquiera de pDual-Hsp65-gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP129-gp64, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64, pDual-Pfs25-gp64, pDual-H5N1/HA1-gp64, pDual-SARS/S-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-N2e-gp64, pCP-HA1/NC00-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1 vp39 y pCP-H1N1/NP-vp39.

(8) Procedimiento para obtener un baculovirus recombinante que incluye las etapas de: producción de un vector de transferencia que comprende una estructura en la que se han incorporado un promotor dual y un gen de fusión, caracterizado por que comprende por lo menos un gen que codifica una proteína que puede constituir un componente de una partícula vírica y de por lo menos, un gen extraño inmunogénico, se unen por debajo del promotor dual, uniendo un promotor de vertebrados y otro promotor baculovírico; y co-transfección del vector de transferencia y de un ADN baculovírico a una célula huésped de un insecto; y separación del baculovirus recombinante.

(9) El procedimiento según el apartado (8), caracterizado por que el gen que codifica por lo menos una proteína que puede constituir un componente de la partícula vírica, es cualquiera de un gen gp64 baculovírico, un gen de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, un gen de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I, un gen de la glicoproteína de membrana de un virus sincicial respiratorio humano, un gen de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe de tipo A, un gen de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe de tipo B, un gen de la glicoproteína del virus del herpes simplex, y un gen de la proteína S del virus de la hepatitis murina.

(10) El procedimiento según el apartado (9), en el que el promotor de vertebrados es seleccionado a partir de un promotor citomegalovírico, un promotor SV40, un promotor retrovírico, unb promotor metalotioneínico, un promotor de proteínas e choque térmico, un promotor CAG, un promotor 1α del factor de elongación, un promotor actínico, un promotor ubiquitínico, un promotor de albúmina y un promotor MHC de tipo II.

(11) El procedimiento según cualquiera de los apartados (8) a (10), en el que el promotor baculovírico es seleccionado a partir de un promotor polihedrínico, un promotor p10, un promotor IE1, un promotor p35, un promotor p39, y un promotor gp64.

(12) El procedimiento según cualquiera de los apartados (8) a (11), en el que el gen extraño inmunogénico es seleccionado a partir de un antígeno de la malaria, un antígeno de la gripe, un antígeno de *M. Tuberculosis*, un antígeno del virus SARS, un antígeno del virus de la fiebre del oeste del Nilo, un antígeno del virus de la fiebre del dengue, un antígeno de HIV, un antígeno del HCV, un antígeno de la leishimaniosis, un antígeno tripanosónicol un antígeno parásito de aves aislado, o un antígeno de fusión de, por lo menos, uno seleccionado a partir de estos grupos génicos antigénicos con una citoquina.

(13) El procedimiento según cualquiera de los apartados (8) a (12), en el que el baculovirus recombinante es cualquiera de AcNPV-Dual-Hsp65, AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-Dual—PbTRAMP, AcNPV-Dual-PbAMA1D123, AcNPV-Dual-PbMSP129, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-Dual-H5N1/HA1, AcNPV-Dual-SARS/S, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/N2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-GA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

(14) Se ha incorporado un vector de transferencia que incluye una estructura en la cual un gen de fusión que incluye por lo menos un gen que codifica una proteína que puede constituir un componente de una partícula vírica, y por lo menos, un gen extraño inmunogénico, se unieron por debajo de un promotor dual, uniendo un promotor de un vertebrado y otro promotor baculovírico.

(15) Se ha incorporado el vector de transferencia según el apartado (14), que comprende la estructura en la que el gen de fusión que incluye el gen que codifica, por lo menos, una proteína que puede constituir un componente de la partícula vírica y de por lo menos, un gen extraño inmunogénico, se unieron por debajo del promotor dual, uniendo un promotor de vertebrado y otro promotor baculovírico.

(16) El vector de transferencia según los apartados (14) o (15), caracterizado por que el gen que codifica, por lo menos, una proteína que puede constituir un componente de la partícula vírica, es uno del gen gp64 baculovírico, del gen de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, del gen de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo I, del gen de la glicoproteína de membrana del virus sincicial respiratorio humano, del gen de la proteína hemaglutinínica del virus de la gripe, de un gen de la glicoproteína del herpes simple, y de un gen de la proteína S del virus de la hepatitis murina.

(17) El vector de transferencia según el apartado (15), en el que el promotor de vertebrado se selecciona a partir de cualquiera de los promotores de un citomegalovirus, del SV40 de un retrovirus de la metalotioneina, de una proteína de choque térmico, de CAG, de un promotor 1α de un factor de elongación, de un promotor actínico, de un promotor de la ubiquitina, de un promotor de la albúmina y de uno de MHC del tipo II.

(18) El vector de transferencia según cualquiera de los apartados (15) a (17), en el que el promotor baculovírico se selecciona a partir de un promotor polihedrínico, de p10, de IE1, de IE2, de p35, de p39 y de gp64.

(19) El vector de transferencia según cualquiera de los apartados (15) a (18) en el que el gen extraño inmunogénico se selecciona a partir de cualquiera de los antígenos de la malaria, de la gripe, de *M. Tuberculosis*, del virus SARS, del virus de la fiebre del oeste del Nilo, del de la fiebre del dengue, del HIV, del HCN, de leishmania, del tripanosoma, del antígeno único del parásito de aves, o de un antígeno de fusión de uno seleccionado a partir de este grupo de genes antigénicos con una citoquina.

(20) El vector de transferencia según cualquiera de los apartados (15) a (19), que es cualquiera de pDual-Hsp65-gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP129, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64m pDual-Pfs25-gp64, pDual-H5N1/HA1-gp64, pDual-SARS/S-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-N2e-gp64, pCP-HA1/NC99-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1-vp39 y pCP-H1N1/NP-vp39.

(21) Baculovirus recombinante obtenido mediante el procedimiento de producirlo según cualquiera de los apartados (8) a (13).

(22) El baculovirus recombinante según el documento (21), que es cualquiera de AcNPV-Dual-Hsp65, AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PbTRAMP, AcNPV-Dual-PbAMA1D123, AcNPV-Dual-PbMSP129, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-Dual-H5N1/HA1, AcNPV-Dual-SARS/S, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

(23) Composición farmacéutica que comprende el baculovirus recombinante según los apartados (21) o (22).

(24) La composición farmacéutica según el apartado (23), que incluye cualquiera de AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

(25) Composición farmacéutica que incluye el baculovirus recombinante según (21) o (22), en el que la composición se administra intramuscular, intranasalmente o mediante inhalación.

(26) Vacuna que comprende cualquiera de AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39 como principios activos.

(27) La vacuna según el apartado (26), en el que ésta se administra intramuscular o intranasalmente o mediante inhalación.

(28) Agente terapéutico o preventivo, para la infección por el virus de la gripe, que incluye AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-

H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39, AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39 como principio activo.

(29) El agente terapéutico o preventivo para la infección por el virus de la gripe según el apartado (28), en el que el agente es administrado intramuscular o intranasalmente o mediante inhalación.

(30) Vacuna para la infección por el virus de la gripe, que incluye cualquiera de AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39 como principios activos.

(31) La vacuna para la infección por el virus de la gripe el apartado (30), en la que el agente se administra intramuscular o intranasalmente o mediante inhalación.

Efecto de la invención

Los medicamentos que incluyen el baculovirus recombinante como principio activo son útiles como drogas terapéuticas o preventivas para las enfermedades infecciosas tales como malaria, gripe, tuberculosis y hepatitis, cánceres y enfermedades autoinmunes, o como medicinas celulares y formulaciones vacunales.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un esquema que muestra el efecto preventivo (título de infectividad vírica) del baculovirus recombinante AcNPV-Dual-H1N1/HA1 sobre la infección con el virus de la gripe;

la figura 2 es un esquema que muestra el efecto preventivo (período de supervivencia) del baculovirus recombinante AcNPV-Dual-H1N1/HA1 sobre la infección con el virus de la gripe;

la figura 3 es un esquema que muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de un producto de fusión en células de insectos, infectadas mediante el baculovirus recombinante, el gen HA del virus de la gripe (H1N1/HA1), el gen Hsp65 de *M. tuberculosis* (Hsp65), o el gen CSP del parásito de la malaria (PbCSP) producidos a partir del vector de transferencia.

Carril 1: AcNPV-WT
Carril 2: AcNPV-Dual-H1N1/HA1
Carril 3: AcNPV-WT
Carril 4: AcNPV-Dual-Hsp65
Carril 5: AcNPV-WT
Carril 6: AcNPV-Dual-PbCSP;

La figura 4 es una vista de la tinción de la marcación fluorescencia donde el baculovirus recombinante producido a partir del vector recombinante de transferencia en células de vertebrados, ha expresado un producto de fusión del gen HSP65 de la tuberculosis y del gen gp64.

(A): Células HepG2 transducidas con AcNPV-Dual-Hsp65;
(B): Células HepG2 transducidas con AcNPV-WT.

La figura 5 es una vista que identifica mediante inmunoprecipitación que el baculovirus recombinante producido a partir del vector recombinante de transferencia en las células animales de mamíferos, ha expresado una proteína de fusión codificada por un gen antigénico HA del virus de la gripe y del gen gp64. La inmunoprecipitación de las células HepG2.

Inmunoprecipitación de células HepG2 en las que se introdujo un baculovirus recombinante

Las células HepG2 fueron transducidas con AcNPV-WT (carril 1), AcNPV-CMV-HA entero (carril 2), o AcNPV-Dual-HA1N (carril 3). A las 3 horas después de la transducción, las células se marcaron radioactivamente con metionina [^{35}S] durante 12 horas. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con suero procedente de ratones infectados con el virus H1N1 de la gripe.

La figura 6 es una visión del análisis de transferencia Western que muestra la expresión de la fusión de un gen CSP del parásito de la malaria y del gen gp64 en las partículas víricas del baculovirus recombinante producido a partir del vector recombinante de transferencia en células de insectos.

Carril 1: AcNPV-WT
Carril 2: AcNPV-CMV-PbCSP

Carril 3: AcNPV-PbCSPsurf
Carril 4: AcNPV-Dual-PbCSP

La figura 7 es una vista que muestra los resultados de RT-PCT, que identifica que un baculovirus recombinante del antígeno HA1, obtenido intercambiando un promotor de vertebrado, ha expresado un producto de fusión de HA1 y gp64 en las células HeLa.

La figura 8 es una vista que muestra la producción del anticuerpo IgG específico para un antígeno PbCSP en sueros de ratones inoculados con el baculovirus recombinante.

La figura 9 es una vista que muestra diversas células que producen IFN-□ reactivas a un epitopo CTL de PbCSP en células del bazo de ratones inoculados con el baculovirus recombinante.

La figura 10 es una vista que muestra los efectos preventivos (título de infectividad vírica) mediante el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-M2e sobre la infección con el virus de la gripe.

La figura 11 es una vista que muestra los efectos preventivos (título de infectividad vírica) mediante el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-HA1/NC99 sobre la infección con el virus de la gripe.

La figura 12 es una vista que muestra la producción de anticuerpos IgG específicos para el virus de la gripe en la sangre, inducida por el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-H1N1/HA1 administrados mediante cuatro vías distintas.

La figura 13 es una vista que muestra la producción de anticuerpos IgG e IgA específicos para el virus de la gripe en los lavados nasales y alveolares, inducida por el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-H1N1/HA1 administrado por cuatro distintas vías.

La figura 14 es una vista que muestra los efectos preventivos (título de infectividad vírica) sobre el virus de la gripe en la cavidad nasal, mediante el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-H1N1/HA1 administrado por cuatro vías distintas.

La figura 15 es una vista que muestra los efectos preventivos (título de infectividad vírica) sobre el virus de la gripe intrapulmonar, mediante el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-H1N1/HA1, administrado por cuatro vías distintas.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La representación, en la presente memoria, de abreviaturas para aminoácidos, péptidos, secuencias de bases y ácidos nucleicos acceder a la Comunicación IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Biológica, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984), definida por la IUPAC-IUB, “Guía para la preparación de especificaciones, que incluye las secuencias de bases y aminoácidos” (Oficina de Patentes), y las notas habitualmente utilizadas en la técnica.

Una molécula de ADN comprende, en la presente invención, no sólo una cadena doble de ADN, sino también una sola cadena de ADN, que incluye cadenas codificadas y no codificadas que la componen, no estando limitada a su longitud. Por tanto, el polinucleótido (molécula de ADN) que codifica el gen extraño inmunogénico incluye el ADN bicatenario que incluye el ADN genómico y el ADN monocatenario (cadena codificada) que incluye cADN y el ADN (cadena no codificada) que posee la secuencia complementaria a la cadena codificada y sus fragmentos de ADN sintético si no se indica lo contrario.

El polinucleótido o la molécula de ADN en la presente invención no está definido por una región funcional, y puede incluir, por lo menos, una de una región de supresión de la expresión, una región codificante, una secuencia guía, un exon y un intron.

El polinucleótido incluye también ARN y ADN. El polipéptido compuesto de la secuencia aminoácida determinada y el polinucleótido compuesto de la secuencia determinada de ADN incluye fragmentos, homólogos, derivados y sus mutantes.

Los mutantes del polinucleótido, por ejemplo, el ADN mutante incluye mutantes alélicos que se presentan de forma natural, mutantes que no se presentan de forma natural que tienen deleciones, sustituciones, adiciones e inserciones. Sin embargo, estos mutantes codifican el polipéptido con la misma función sustancialmente, como la función del polipéptido codificado por el polinucleótido antes de la mutación.

En esta exposición, el vector de transferencia se refiere a un plásmido para producir el baculovirus recombinante, que comprende la estructura en la que un gen de fusión que une, por lo menos, un gen que codifica una proteína que puede constituir un componente de una partícula vírica para, por lo menos, un gen extraño inmunogénico, se ha incorporado por debajo de un promotor dual uniendo dos promotores que consisten en uno, de vertebrados, (promotor de mamíferos, de aves, de peces), y otro promotor baculovírico.

Resulta preferido que el gen extraño inmunogénico se localice por debajo del promotor dual y por encima del gen que codifica la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica.

El baculovirus recombinante se utiliza para los vertebrados como el principio activo de los medicamentos o vacunas. Como los vertebrados los mamíferos, incluyendo los que pertenecen al hombre, por ejemplo, caballos, cerdos, ovejas, cabras, monos, ratones, perros y gatos, aves como pollos, codornices, patos, ocas, palomas, pavos, pintados y papagayos, y peces como los jureles, jureles adultos, besugos de mar, medregales, jamelgos, liebres a rayas, liebres ámbar, salmones, salmones rojos, carpas, carpas carpín común, truchas arco iris, trucha de arroyo, y truchas, pueden tomarse como ejemplos.

Se da a conocer el vector de transferencia que comprende la nueva estructura, en la cual el gen de fusión que incluye el gen que codifica una proteína de la membrana vírica que puede expresarse en la célula del insecto, y un gen extraño inmunogénico, se ha incorporado bajo el control de un promotor dual, en el que el promotor vertebrado se ha unido a otro promotor baculovírico. Cotransfectando este vector de transferencia junto con el ADN baculovírico en la célula del insecto para inducir la recombinación homóloga, es posible obtener el baculovirus recombinante en el que el gen de fusión que está bajo el control del promotor baculovírico, expresa en la célula del insecto, y puede producir, una proteína de fusión, capaz de constituir el componente de la partícula vírica que ha brotado y que se ha incorporado.

Cuando el baculovirus recombinante se administra a un vertebrado, la proteína de fusión de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica que ha brotado con la proteína inmunogénica, funciona probablemente como un componente vacunal. El baculovirus recombinante administrado al vertebrado aborda la célula de éste y se produce en ésta un antígeno de fusión con el del antígeno extraño inmunogénico objetivo del genoma vírico, y que funciona como una vacuna de ADN.

Por tanto, en el caso de los mamíferos, administrando el baculovirus recombinante al mamífero, la proteína de fusión de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica con la proteína inmunogénica, se produce en la célula del mamífero, y se piensa que funciona como el agente preventivo o terapéutico para infecciones víricas, protozoos y bacterias, debido a su acción inmunopotencial.

El ADN baculovírico que va a cotransfectarse con el vector de transferencia, puede ser de tipo salvaje, un mutante y un ADN baculovírico recombinante. Las células huésped que van a cotransfectarse incluyen, por ejemplo, células de un insecto tal como *Spodoptera frugiperda*.

En esta exposición, al gen que codifica una secuencia aminoácida de una proteína antigénica que es un inmunógeno inmunoterápico que incluye una terapia vacunal para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas tales como malaria, gripe y tuberculosis, enfermedades autoinmunes y cánceres, por ejemplo al gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína tal como el antígeno de la malaria, el antígeno del virus de la gripe y el antígeno de *M. tuberculosis*, se hace referencia como el gen extraño inmunogénico.

En la presente invención, el gen “extraño” significa el gen que se ha introducido desde el exterior, que corresponde al gen “extraño” incluso si el mismo gen se encuentra en la célula.

En la presente exposición, el gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que es el inmunógeno mencionado, no está limitado particularmente, como el gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína antigénica, siempre que el gen sea el que codifica la secuencia aminoácida de la proteína antigénica que posea inmunogenicidad contra una substancia que cause enfermedades tales como las infecciones, cánceres y las enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de estos genes que codifican la secuencia aminoácida de la proteína antigénica que tiene inmunogenicidad, incluyen los siguientes.

Como genes que codifican la secuencia aminoácida del antígeno de la malaria, pueden ponerse como ejemplos, los que codifican las secuencias aminoácidas de proteínas tales como los antígenos CSP superficiales (proteína circumesporozoítica) de la superficie del esporozoito del parásito de la malaria, la MSP1 (la proteína 1 superficial merozoítica) de una proteína de membrana de la superficie del metrozoito, un antígeno S de la malaria secretado por los eritrocitos infectados con malaria, la proteína PfEMP1 presente en el conjunto de los hematíes infectados con malaria, y las proteínas SERA, TRAMP y AMA1.

Como el gen que codifica la secuencia aminoácida del antígeno del virus de la gripe, pueden ponerse como ejemplo los genes que codifican las secuencias aminoácidas de proteínas tales como el antígeno HA (antígeno hemaglutinínico), antígeno NA (antígeno neuraminidásico), antígeno M2 (antígeno de la proteína matricial) y antígeno NP (antígeno nucleoproteínico).

Como el gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína antigénica para la tuberculosis, los genes que codifican las secuencias aminoácidas tales como HSP65 (proteína de choque térmico de 65-kDa), antígeno-α (Antígeno85A, Antígeno85B, Antígeno85C), Mtb72f, MDP-1, ESAT-6, MPB51m, Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39 y

Mtb11).

Con respecto a los genes de vertebrados, como los de mamíferos, pueden ponerse como ejemplo los que codifican las secuencias aminoácidas de las proteínas antigénicas de las enfermedades infecciosas en el hombre, y en animales como pollos, caballos, ovejas, monos, ratones, perros y gatos. Como genes de las aves, pueden ejemplificarse los genes antigénicos (por ejemplo, el antígeno S de la gripe) de las aves, de las enfermedades infecciosas en cerdos. Como genes de peces, se incluyen los genes antigénicos de enfermedades infecciosas en jureles, jureles adultos, besugos de mar, medregales, jamelgos, liebre a rayas, liebre ámbar, salmones, salmones rojos, carpas, carpas carpín común, truchas arco iris, trucha de arroyo, y truchas, están incluidos.

Los genes patógenos cuya asociación se ha informado con enfermedades infecciosas en los mamíferos mencionados, aves y peces, están fácilmente disponibles en las instituciones en las que los datos públicos, tales como el registro de GenBank, se guardaron los genes patógenos.

En esta exposición para los genes extraños inmunogénicos, además de los antígenos inmunes mencionados que se encuentran fuera del organismo humano, son dirigidos también como genes extraños inmunogénicos en esta exposición, por ejemplo, genes citoquímicos, que se encuentran dentro del cuerpo humano, por ejemplo, un gen IL-12, un IL-6, uno del receptor IL-6, un IL-2, un IL-18, un IFN-γ y un M-CSF, o genes de fusión obtenidos fusionando un antígeno dado que posee inmunogenicidad con la proteína antigénica utilizando la tecnología recombinante.

En la presente exposición, es posible proporcionar el vector de transferencia que incluye estos genes extraños inmunogénicos, y el baculovirus recombinante obtenido mediante su recombinación homóloga, así como proporcionar una composición farmacéutica que incluye el baculovirus recombinante que posee el gen extraño inmunogénico como principio activo y la formulación vacunal compuesta por la composición farmacéutica.

El baculovirus utilizado para la presente exposición es un virus patógeno de insectos que causa la infección en éstos, y comprende un grupo (*Baculoviridae*) de virus ADN que poseen una cadena cíclica bicatenaria como gen. Entre ellos, un grupo a los que se alude como “virus de la poliedrosis nuclear” (NPV), contiene una inclusión a la que se hace referencia como polihedron, en un núcleo en una célula infectada en la última fase de la infección. Incluso si el gen extraño que va a expresarse, se inserta en lugar de un gen polihedrónico, el virus infecta, se desarrolla y produce el producto deseado del gen extraño en grandes cantidades, sin problemas. De este modo, se ha aplicado de forma práctica a la obtención de la proteína deseada recientemente.

Como baculovirus utilizados, pueden ponerse como ejemplo el virus *Autographa Californica* de la poliedrosis nuclear; AcNPV, virus de la poliedrosis nuclear *Bombyx mori*: BmNPV, Virus de la poliedrosis nuclear *Orgyia pseudotsugata*; OpNPV y virus de la poliedrosis nuclear *Lymantria disper*: LdNPV.

El ADN baculovírico puede ser cualquier ADN que pueda llevar a cabo la recombinación homóloga con el vector de transferencia de esta exposición. Específicamente el gen vírico del ADN baculovírico que puede llevar a cabo la recombinación homóloga con el vector de transferencia, es de 130 kbp, que es enorme, y el gen extraño inmunogénico que puede insertarse es de 15 kbp o más. El gen baculovírico, en sí mismo, se expresa en las células de vertebrados. Así, casi no es necesario considerar su citotoxicidad y por tanto, se cree que no se induce una respuesta inmune peligrosa.

(1) Vector de transferencia y su producción

Producción del ADN del gen extraño inmunogénico

El ADN del gen extraño inmunogénico capaz de fusionarse con el gen vírico, que constituye uno de los componentes del vector de transferencia del baculovirus, puede producirse fácilmente, y obtenerse mediante síntesis basada en la información secuencial ácido nucleica del polinucleótido que codifica la secuencia aminoácida de la proteína antigénica, que tiene como objetivo la inmunogenicidad que se da a conocer en esta Memoria, no sintetizando directamente (procedimiento de síntesis química del ADN), el ADN que corresponde a la secuencia ácido nucleica de una región codificante del gen extraño inmunogénico, que se basa en la información de la secuencia ácido nucleica del gen extraño inmunogénico. Las técnicas generales de ingeniería genética pueden aplicarse a esta producción (por ejemplo, véase Clonación Molecular, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Zoku Seikagaku Jikken Kpuza, “Idenshi Kenkyuho I, II, III”, editado por la Sociedad Japonesa de Bioquímica, 1986.

Como los procedimientos de síntesis del ADN, la síntesis química está relacionada con el procedimiento del triester fosfato y de la amidita fosfato (J. Am. Chem. Soc., 89, 4801(1967); ibid., 91, 3350(1969); Science, 150, 178(1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859(1981), ibid., 24, 245(1983)) y sus procedimientos de combinación pueden tomarse como ejemplo. Más específicamente el ADN puede sintetizarse químicamente mediante el procedimiento de la fosforamidita o el del triester, y puede sintetizarse utilizando un sintetizador automático de oligonucleótidos disponible comercialmente. Puede obtenerse con fragmento bicatenario sintetizando una cadena complementaria e hibridizando la cadena complementaria con una única cadena químicamente sintetizada bajo condiciones apropiadas, o añadiendo la cadena complementaria con secuencias cebadoras apropiadas para la cadena única

sintetizada químicamente, utilizando una ADN polimerasa.

En esta exposición, pueden ponerse como ejemplos específicos un aspecto del ADN del gen extraño inmunogénico producido como un aspecto específico del ADN del gen extraño inmunogénico producido en la presente exposición, puede ponerse como ejemplo el ADN compuesto de la secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoácida de la proteína del antígeno de la malaria, o la secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoácida de la proteína antigénica del virus de la gripe.

El ADN que se utiliza en esta exposición, no se limita a la secuencia de longitud total del ADN que codifica la secuencia aminoácida del polipéptido de la proteína antigénica que posee inmunogenicidad, pudiendo consistir en la secuencia de ADN que codifica una secuencia parcial tal larga como la proteína de la secuencia aminoácida codificada por la secuencia de ADN que posee la inmunogenicidad.

El ADN utilizado en esta exposición puede ser la secuencia de ADN obtenida fusionando la secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoácida de la proteína antigénica que posee la antigenicidad para el gen de la citoquina presente en el organismo humano, por ejemplo, el gen IL-12, IL-1, IL-6, el gen receptor IL-6, IL-2, IL-18, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TNF, TGF-β, GM-CSF y M-CSF.

La secuencia del ADN fusionado no se limita a la longitud total de la región codificante de la secuencia del ADN que codifica la secuencia aminoácida del polipéptido de la proteína antigénica que posee la antigenicidad y la secuencia del ADN del gen de la citoquina, pudiendo ser parcial la secuencia de ADN.

El ADN del gen extraño inmunogénico no se limita a la molécula de ADN que posee tal secuencia particular de ADN, pudiendo mostrar asimismo la secuencia de ADN obtenida combinando y seleccionando el codon opcional para cada residuo aminoácido. La selección de codon puede llevarse a cabo según los procedimientos estándar. En este momento, por ejemplo, es posible considerar una utilización frecuente del codon en el huésped utilizado. (Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)).

El procedimiento para producir el ADN del gen extraño inmunogénico utilizado para la presente exposición, mediante técnicas de ingeniería genética, puede llevarse a cabo más específicamente preparando una biblioteca de cADN de un origen apropiado, que exprese el ADN del gen extraño inmunogénico según los procedimientos estándar, y seleccionando el clon deseado a partir de la biblioteca, utilizando una sonda apropiada o un anticuerpo contra un producto expresado que es inherente al gen extraño inmunogénico (véase Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)).

Como se expuso anteriormente, pueden tomarse como ejemplo, como orígenes del ADN genómico, varias células, tejidos y células cultivadas derivadas de ellos, que expresan el ADN del gen extraño inmunogénico. En particular resulta preferido utilizar el extracto de los hematíes infectados con los parásitos de la malaria, el extracto de las células infectadas con el virus de la gripe, o el extracto de *M. tuberculosis* como el origen. La extracción y separación del ADN y ARN totales del origen, la separación y purificación del ARNm y la obtención y clonación del ADNc, pueden llevarse a cabo según los procedimientos estándar.

La producción del ADN del gen extraño inmunogénico puede también realizarse extrayendo el ARNm de cada inmunogen, añadiendo entonces poly A al ARN, y recuperando entonces el ARN al que se le ha añadido poly A, dando lugar a ADNc utilizando una transcriptasa inversa, añadiendo sitios enzimáticos de restricción a ambos extremos del ADNc y utilizando una biblioteca fágica preparada incorporando el ADNc al fago, además de obtener, empleando la biblioteca de ADNc de cada inmunógeno obtenido por la extracción, separación y purificación del ARNm a partir del tejido inmunogénico o de las células que utilizan el extracto como origen.

Puede ponerse como ejemplo el procedimiento de rastreo del ADN del gen extraño inmunogénico a partir de la biblioteca de ADNc, que no está particularmente limitado, y puede llevarse a cabo según procedimientos ordinarios. Como procedimiento específico, por ejemplo, el de seleccionar un clon correspondiente de ADNc mediante rastreo inmunológico, utilizando un anticuerpo específico (por ejemplo, el anticuerpo antimalaria, el anticuerpo antivirus de la gripe, el anticuerpo anti-*M. tuberculosis*) contra la proteína producida por el ADNc; un procedimiento de hibridización en placa, utilizando una sonda que se une selectivamente a la secuencia del ADN objetivo; un procedimiento de hibridación colonial; y sus combinaciones.

Como sonda utilizada en los procedimientos de hibridización, los fragmentos de ADN sintetizados químicamente, basados en la información para la secuencia del ADN del gen extraño inmunogénico, son habituales. El gen extraño inmunógeno ya obtenido, y las secuencias de ADN de sus fragmentos, puedan utilizarse ventajosamente como la sonda mencionada. Además, un cebador codificante y uno no codificante que se diseñaron basándose en la información secuencial del ADN del gen extraño inmunógeno, pueden utilizarse asimismo como sonda para el rastreo mencionado.

El ADN (nucleótidos) utilizado como sonda, el ADN parcial (nucleótidos) que corresponde a la secuencia del ADN del gen extraño inmunogénico, y a uno que, por lo menos, posee 15 ADN consecutivos, preferentemente, por lo

menos, 20 ADN consecutivos y más preferentemente por lo menos 30 ADN consecutivos. Como sondas, también puede utilizarse un clan positivo en sí mismo, para producir el ADN anteriormente mencionado.

Cuando el ADN del gen extraño inmunogénico se obtiene, puede utilizarse apropiadamente un procedimiento de amplificación ADN/ARN mediante PCR (Science, 230m 1350(1985)). En particular, cuando un ADNc de longitud total se obtiene dificultosamente de la biblioteca, se utiliza apropiadamente el procedimiento RACE [Amplificación rápida de los extremos del ADNc; Jikken Igaku 12(6), 35(1994)], en particular, el procedimiento 5'-RACE [M.A. Forman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 8, 8998(1988)], se utiliza apropiadamente.

El cebador utilizado para la PCR puede diseñarse basándose en la información secuencial del ADN del gen extraño inmunogénico, y sintetizarse según los procedimientos estándar. Como este cebador, tal como se muestra en los ejemplos que se describen más adelante pueden utilizarse las porciones del ADN (el cebador promotor SP6 y el cebador finalizador T7) que se añaden a ambos extremos del plásmido sectorial, en los que el ADN del gen extraño inmunogénico se ha incorporado.

El aislamiento/purificación del fragmento ADN/ARN amplificado mediante PCR, puede llevarse a cabo según los procedimientos estándar, por ejemplo, electroforesis en gel.

Para el ADN del gen extraño inmunogénico obtenido como anteriormente, o los diversos fragmentos de ADN, sus secuencias de ADN pueden determinarse según los procedimientos estándar, por ejemplo, el procedimiento didesoxi [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463(1977)] o el de Maxam-Gilbert [Methods is Enzymology, 65, 499(1980)], o utilizando simplemente, un equipo de secuenciación comercialmente disponible.

El gen que codifica los aminoácidos de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, puede ser cualquiera siempre que sea el gen que codifica la proteína que pueda expresarse como la que es capaz de ser componente de la partícula vírica en las células de los insectos y como proteína fusión, fusionando el gen extraño inmunogénico en la célula objetivo.

Como genes que codifican los aminoácidos de las proteínas capaces de constituir las partículas víricas, pueden ponerse como ejemplo el gen de una proteína gp64 (GenBank, Nº L22858 del Registro), el de una proteína del virus de la estomatitis vesicular (GenBank, Nº M21416) de una proteína del virus herpes simple (KOS; GenBank, Nº K01760), de una proteína gp120 del virus de inmunodeficiencia humana de tipo I (GenBank, Nº U47783), de la membrana del virus sincitial respiratorio humano (GenBank, Nº M86651), de una proteína hemoaglutinímica del virus tipo A de la gripe (GenBank Nº U38242), o de las proteínas que envuelven a los virus estrechamente emparentados con el baculovirus. En la presente invención, puede ponerse como ejemplo el gen gp64 que se describe a continuación.

El ADN del gen que codifica los aminoácidos de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, puede obtenerse fácilmente, y sintetizarse basándose en la información secuencial ácido nucleica del polinucleótido que codifica la secuencia aminoácida del polipéptido del gen, que codifica los aminoácidos de la proteína objetivo que puede constituir el componente de la partícula vírica, o sintetizando directamente el ADN que corresponde a la secuencia nucleótida que codifica la secuencia aminoácida que se basa en la información secuencial aminoácida del gen que codifica los aminoácidos de la proteína capaz de ser componente de la partícula vírica (síntesis química del ADN), como ocurre con la producción del ADN del gen extraño inmunogénico.

Una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia ácido nucleica que codifica aminoácidos de una proteína capaz de constituir un componente de una partícula vírica, no se limita a la longitud completa de una región codificante, y puede ser ADN compuesto de una secuencia parcial de ADN.

Así ocurre con la obtención de la molécula de ADN del gen extraño inmunogénico, pudiéndose, en general, producir el ADN del gen que codifica los aminoácidos de la proteína capaz de constituir el componente de la partícula vírica, mediante técnicas generales de ingeniería genética (por ejemplo, véase Molecular Cloning 2ª Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Zoku Seikagaku Jikken Kouza, "Idenshi Kenkyuho I, II, III" editado por la Sociedad Japonesa de Bioquímica, 1986).

En esta exposición, puede utilizarse asimismo el plásmido vectorial comercialmente disponible, en el que una parte del promotor que controla la expresión del gen extraño inmunogénico que se describe más tarde, se ha incorporado ya, y el gen (o una parte suya) que codifica los aminoácidos de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, se ha introducido previamente.

Promotores de vertebrados

Como promotor de vertebrados, (que puede funcionar en los vertebrados), que es uno de los componentes del vector de transferencia, pueden ponerse como ejemplos los promotores de aves y de peces.

Promotores de mamíferos

Como promotores de mamíferos (que pueden funcionar en mamíferos), que es uno de los componentes del vector de transferencia, pueden ponerse como ejemplos un promotor citomegalovírico, un promotor SV40, un promotor retrovírico, un promotor metalotioneínico, un promotor de una proteína de choque térmico, un promotor CAG, un promotor 1α del factor de elongación, un promotor actínico, un promotor de la ubiquitina, un promotor de la albúmina y un promotor MHC de tipo II.

Promotores de aves

Como promotores de aves, pueden ponerse como ejemplos, el promotor actínico, el de proteínas de choque térmico, el del factor de elongación, el de la ubiquitina y el de la albúmina.

Promotores de peces

Como promotores de peces, pueden ponerse como ejemplo, el de actina, el de proteínas de choque térmico, y el del factor de elongación.

Promotores del baculovirus

Como promotor del baculovirus, que es uno de los componentes de su vector de transferencia, pueden ponerse como ejemplo el de la polihedrina, un promotor p10, un promotor IE1, un promotor p35, un promotor p39, y un promotor gp64.

Obtención del vector recombinante de transferencia

La presente exposición se refiere al nuevo vector de transferencia que posee la estructura capaz de expresar el gen extraño inmunogénico objetivo como la proteína antigénica tanto en las células de insectos como en las células de vertebrados, particularmente en las de mamíferos. En esta exposición, la estructura del nuevo vector de transferencia obtenido, se caracteriza por que la secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoácida de la proteína inmunogénica deseada y que la secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede ser la componente de la partícula vírica, se unen por debajo de los promotores unidos, que son un promotor vertebrado, particularmente el de mamíferos, y otro promotor del baculovirus. Las regiones de ADN que incluyen las secuencias de ADN de dos promotores son la de un promotor vertebrado, particularmente el promotor de mamíferos, y otro del baculovirus, pueden unirse directamente, o puede estar presente entre las secuencias de los dos promotores, una secuencia interviniente de ADN, (pero, en este caso, son necesarios promotores respectivos para tener actividad en las células de insectos y en las de vertebrados, particularmente en células de mamíferos). Bien el promotor de vertebrados, particularmente el promotor de mamíferos o el promotor baculovírico para unirse, pueden disponerse más cerca del gen que va a expresarse en su región promotora. En los ejemplos que se describen más adelante, el baculovirus se dispone más cerca del gen que va a expresarse que del promotor mamífero.

En la estructura, para el gen de fusión que incluye el gen que codifica la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica y el gen extraño inmunogénico deseado, estos dos genes pueden estar directamente alienados, o la secuencia del ADN interviniente puede encontrarse entre ellos, pero es necesario disponer que el ADN no de lugar a un marco de lectura. Es preferible que una región presentadora de un antígeno de la proteína codificada por el gen extraño que posee la inmunogenicidad deseada, se fusione con la proteína capaz de constituir el componente de la partícula vírica. Así, es necesario utilizar la forma fusionada sin fragmentar la proteína codificada por el gen extraño, proteína que posee la inmunogenicidad deseada de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica.

Un gen de fusión que incluye estos dos genes puede formarse anteriormente, y puede incorporarse al vector. Alternativamente, cualquier gen puede incorporarse al vector anteriormente, y subsiguientemente el otro gen puede incorporarse al vector para formar el gen de fusión en el vector.

Para las manipulaciones anteriores, pueden utilizarse vectores de expresión comercialmente disponibles que ya contienen las regiones promotoras del promotor de vertebrados anteriormente mencionado, particularmente el promotor de mamíferos y el del baculovirus, así como las regiones génicas que codifican la secuencia aminoácida que puede constituir el componente de la partícula vírica, que son porciones de la constitución que es necesaria como vector de transferencia. Utilizándolas, los componentes requeridos pueden insertarse, insertando la secuencia de ADN en la que el gen extraño inmunogénico deseado se ha fusionado al gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína capaz de constituir el componente de la partícula vírica en la región de clonación del vector, fragmentando opcionalmente con enzimas de restricción o incorporándolo en otro vector, o insertando el gen extraño inmunogénico deseado en el lado del extremo N de la región del ADN del gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína capaz de constituir el componente de la partícula vírica ya incorporada en el plásmido.

Para la detección de la proteína, puede añadirse una señalización His o HVS antes de una cola poly A en un lado

del extremo C de la secuencia del ADN, que fusione el gen extraño inmunogénico deseado con el gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína capaz de constituir el componente de la partícula vírica. Alternativamente, para la expresión, la purificación y la detección de la proteína recombinante de fusión, la secuencia de ADN que codifica una secuencia FLAG compuesta de 8 aminoácidos, puede insertarse como un péptido de señalización entre la región promotora y la región en la que el gen extraño inmunogénico deseado se ha fusionado al gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica. El vector plasmídico que posee la estructura capaz de expresar la proteína extraño inmunogénica deseada como la proteína antigénica tanto en las células de insectos como en las células de los vertebrados, pudiéndose producir particularmente la célula de los mamíferos utilizando el plásmido comercialmente disponible que posee la estructura que ya satisface su parte. La secuencia aminoácida del péptido puede intervenir para fragmentar la proteína de fusión con el enzima en la célula de vertebrados. En el vector de transferencia, puede disponerse, por encima de dos promotores, un potenciador para aumentar una actividad transcripcional en la célula e vertebrados, particularmente en la célula de los mamíferos, o la secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoácida de un péptido señal, para facilitar la secreción extracelular de la proteína expresada en el huésped, puede unirse al gen para fusionarse y expresarse. Una región finalizadora de vertebrados, por ejemplo, una β globulina de conejo finalizadora que es efectiva en la célula de vertebrados, puede disponerse para finalizar la transcripción por debajo del gen que va a fusionarse y expresarse.

Como antes, pueden obtenerse el vector de transferencia capaz de expresar el gen de fusión del gen extraño inmunogénico que puede expresar la inmunogenicidad deseada en la partícula baculovírica y el gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica.

Para ejemplos específicos del vector de transferencia y el procedimiento para su producción tal como se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación, el vector de transferencia, compuesto por la estructura en la que el promotor citomegalovírico (CMV), el promotor CAG modificado a partir del promotor CMV, y el promotor de la ubiquitina (UBB) se fusionaron con el potenciador CMV como el promotor de vertebrados, particularmente el promotor de mamíferos y el promotor polihedrina (Polh) como promotor del baculovirus, fusionándose la secuencia de ADN en la que el gen del antígeno del virus de la gripe, el gen del antígeno malárico y el gen del antígeno del *M. tuberculosis*, como genes extraños, y el gen del antígeno gp64, como gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, ejemplificándose como pDual-Hsp65-gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP129-gp64, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64, pDual-Pfs25-gp64, pDual-H5N1/HA1-gp64 y pDual-SARS/S-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-M2e-gp64, pCP-HA1/MV99-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1-vp39, pCP-H1N1/NP-vp39.

(2) Producción del baculovirus recombinante

Se da a conocer el procedimiento para obtener el baculovirus recombinante, que comprende las etapas de producción del vector de transferencia compuesto de la estructura en la que se ha incorporado el gen de fusión que comprende, por lo menos, un gen que codifica la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica y por lo menos, un gen extraño inmunogénico unido por debajo de un promotor dual que une un promotor vertebrado y otro del baculovirus, cotransfectando el vector de transferencia y el ADN baculovírico en la célula huésped y separando el baculovirus recombinante.

En el mencionado procedimiento para producir el baculovirus recombinante, los métodos para introducir el ADN recombinante deseado (vector de transferencia) en el huésped, y los de transformarlos a continuación, no están particularmente limitados, pudiéndose utilizar diversos procedimientos que son bien conocidos y habitualmente utilizados, y que por ejemplo, pueden emplearse habitualmente, y que por ejemplo, pueden realizarse según la habitual tecnología de recombinación génica (por ejemplo, Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5990 (1983). El ADN recombinante (vector de transferencia) puede expresarse y obtenerse aludiendo a Ohno et al., “Tanpaku Jikken Protocol 1 Functional analysis, Saibo Kogaku Bessatu Jikken Protocol Series, 1997, Shujunsha”. Para las técnicas generales de manejo de las células de insectos, pueden utilizarse la recombinación técnica y la cotransfección, las mismas técnicas que en los procedimientos bien conocidos de conseguir virus recombinantes en las células de insectos (Zenji Matsuura, Proteins, Nucleic acids and Encimes, 37:211-222, 1992; Zenji Matsuura, Saibo 33(2): 30-34, 2001).

Los baculovirus recombinantes resultantes pueden cultivarse según los procedimientos estándar. Mediante el cultivo, un producto de fusión (producto expresado), en el que el ADN del gen extraño inmunogénico y el ADN que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, se han fusionado, diseñándose tal como se deseaba para expresarse, produciéndose (acumulándose) y segregándose al interior, al exterior celular, o en la membrana de ésta.

Como medios utilizados para el cultivo, pueden seleccionarse apropiadamente y emplearse varios habitualmente usados, dependiendo de las células huésped utilizadas, pudiéndose llevar a cabo el cultivo bajo condiciones apropiadas para el crecimiento de las células huésped.

El procedimiento para producir el baculovirus recombinante comprende más particularmente las etapas de preparación del ADN baculovírico para llevar a cabo la recombinación homóloga con el vector de transferencia producido anteriormente, y co-transfectándolo junto con el ADN baculovírico en las células de insectos tales como las células Sf-9 y Sf-21 de *Spodoptera frugiperda*. Las células Tn5 (cinco grandes células proporcionadas por Invitrogen) derivadas de *Trichoplusia ni* como células huésped.

El ADN baculovírico producido anteriormente para llevar a cabo la recombinación homóloga con el vector de transferencia puede ser cualquiera de los de tipo salvaje, el mutante o el ADN baculovírico recombinante.

Un ADN baculovírico puede potenciar la probabilidad de recombinación homóloga siempre que tenga la estructura del ADN homóloga al ADN derivado del ADN baculovírico localizado por encima de un promotor dual utilizado por el vector de transferencia, de forma que realice la recombinación homóloga con el vector de transferencia, excepto para el ADN derivado de un baculovirus que realiza un atrapamiento en el que se han fusionado un gen de fusión, el ADN en la región promotora dual, el gen extraño inmunogénico, y el gen que codifica la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica.

Para inducir la recombinación homóloga es mejor que el vector de transferencia y el ADN baculovírico se mezclen en una relación ponderal de 1:1 a 10:1 aproximadamente.

Después de llevar a cabo la introducción simultánea en las células de insectos, mediante la etapa de cotransfección, y realizando el cultivo de las células, se obtuvieron, a partir del sobrenadante del cultivo, placas víricas, suspendiéndolas entonces en el medio, eluyendo subsiguientemente el virus a partir del agar mediante un torbellino, para conseguir una solución que incluya el virus recombinante.

Anteriormente, puede utilizarse el ADN baculovírico comercialmente disponible, y, por ejemplo, se puede emplear ADN BacVector-1000 y ADN BacVector-2000 (proporcionado por Novagen), en el que el gen polihedrínico se ha eliminado de AcNPV.

La cotransferencia del vector de transferencia y el ADN baculovírico obtenido anteriormente, en las células de insectos, para la recombinación homóloga, pueden llevarse a cabo utilizando el equipo de transfección vectorial comercialmente disponible que se describe antes (Equipos BacVector de Transfección suministrados por Novagen), según las instrucciones adjuntas al equipo vectorial de transfección. Como antes, el vector de transfección obtenido antes, puede cotransfectarse junto con el ADN baculovírico en las células de insectos tales como las Sf-9 para obtener el baculovirus recombinante.

Según el procedimiento anterior de producción del baculovirus recombinante, los vectores de transferencia tales como pDual-Hsp65-gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP129-gp64, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64, pDual-Pfs25-gp64, pDual-H5N1/HA1-gp64, pDual-SARS/S-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-M2e-gp64, pCP-HA1/NC99-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1-vp39, pCP-H1N1/NP-vp39, y el ADN baculovírico se utilizaron y co-transfectaron en las células Sf-9 de insectos para obtener los baculovirus recombinantes tales como AcNPV-Dual-Hsp65, AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PbTRAMP, AcNPV-Dual-PbAMA1D123, AcNPV-Dual-PbMSP129, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39, AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

Asimismo pueden obtenerse, los baculovirus recombinantes tales como AcNPV-Dual-H5N1/HA1 y AcNPV-Dual-SARS/S.

Además del procedimiento anterior para producir el baculovirus recombinante como otro procedimiento para obtenerlo, es posible emplear el método de inserción eficiente del gen extraño en *Escherichia coli*, utilizando un trasposon para un fagénido (bácmido), en el que se ha incorporado el genoma completo baculovírico. Según el procedimiento, el baculovirus recombinante puede obtenerse fácilmente y recuperarse para extraer sólo el bácmido que transporta el gen vírico de las células microbiana y transfectarlo a la célula del insecto.

La purificación del baculovirus recombinante obtenido mediante el procedimiento mencionado de producción del baculovirus recombinante, puede llevarse a cabo utilizando el procedimiento de purificación vírica que se conoce públicamente.

Para la purificación del baculovirus recombinante, por ejemplo, de 0,5 a 1,0 mL de un virus de partida (habitualmente $1 \times 10^{7-8}$ pfu/mL), obtenido mediante el procedimiento anterior para producir el baculovirus recombinante, se inoculan a las células de insectos (1×10^{7} células/discos de 10 cm) tales como células Sf-9, recuperándose el sobrenadante del cultivo varios (4 días) después de la infección, y se suspendió en un tampón como PBS, un sedimento vírico

obtenido mediante centrifugación. La suspensión resultante se aplicó a un gradiente de sacarosa de 10 al 60%, que se centrífugo entonces (25,000 rpm, 60 minutos, 4ºC), guardándose el sedimento resultante del virus recombinante purificado en tampón PBS al 4ºC.

Puede evaluarse mediante un ensayo de las placas (Fields VIROLOGY 4ª Edición p29-32 2001), utilizando células de insectos como las Sf-9, el título de infectividad del virus recombinante purificado resultante.

En el virus recombinante que se pone como ejemplo en la presente exposición, el extremo N de la proteína gp64 del baculovirus queda expuesto fuera de la partícula, y su extremo C queda expuesta dentro de ella. De este modo, si la proteína codificada por el gen extraño inmunogénico se fusiona con el extremo N de gp64, su entidad como componente de la partícula vírica, se expone en el exterior de la partícula de la proteína vírica en las células de insectos, y, de este modo el antígeno es presentado más fácilmente lo que es apropiado para conseguir el objetivo de formulación vacunal de la presente invención.

(3) Composición farmacéutica de esta invención (medicamento que incluye un baculovirus recombinante como principio activo)

El baculovirus recombinante que constituye un principio activo en la composición farmacéutica de la presente invención, puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética que se muestran en el apartado (2) mencionado.

Es importante para la composición farmacéutica dela invención de la presente invención, contener como principio activo, el baculovirus recombinante obtenido mediante la recombinación homóloga del ADN baculovírico y del vector de transferencia de forma que el gen de fusión que fusiona el gen extraño inmunogénico, al gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, puede expresarse en las células de insectos y las células de vertebrados, particularmente en las células de mamíferos, que incluyen al hombre.

En particular, la presente invención, proporciona la composición farmacéutica que comprende el baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP particular como principio activo.

El baculovirus recombinante de la presente invención AcNPV-Dual-PfCSP, que constituye el principio activo en la composición farmacéutica de la presente invención, ejerce las acciones que potencian un efecto preventivo de la infección sobre los antígenos infecciosos, y reduce el título de infectividad, pudiéndose utilizar esta acción o actividad para procedimientos de enfermedades asociadas con la infección de las células o tejidos diana. Dichas células diana afectadas por la infección incluyen, por ejemplo, células sanguíneas, y otras células dianas, que incluyen células hepáticas, células renales, células cerebrales, células pulmonares, células epiteliales y musculares. Los tejidos que comprenden estas células incluyen pulmones, hígado, riñón, venas arteriales y venas, estómago, intestinos, uretra, piel y músculo.

La composición farmacéutica potencia el efecto preventivo sobre la infección sobre los antígenos infecciosos tales como los maláricos, por ejemplo, el antígeno superficial CSP de la superficie esporozoítica del parásito de la malaria, y reduce el título de infectividad (por ejemplo, el título de infectividad vírica). De este modo, se incrementa el período de supervivencia y la tasa de ésta de los mamíferos, incluyendo a los seres humanos, a los que se administró la composición farmacéutica de la presente invención, comparados con aquellos a los que no se administró. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención es útil como preventiva o agente terapéutico para la infección, particularmente con malaria.

La composición farmacéutica de la presente invención es útil como agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas causadas por los patógenos y sus complicaciones, utilizando las acciones para potencial el efecto preventivo de la infección sobre el antígeno infeccioso, reduciendo el título de infectividad.

La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse como la que incluye la cantidad farmacéuticamente efectiva del baculovirus recombinante, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Para el efecto preventivo infeccioso del baculovirus recombinante de la presente invención, en los vertebrados particularmente, los mamíferos que incluyen a los seres humanos o a las células de mamíferos, por ejemplo, la composición farmacéutica producida por el baculovirus recombinante de la presente invención y la composición que puede añadirse para la administración farmacéutica se administre intramuscularmente, intranasalmente o mediante inhalación en los vertebrados, particularmente, los mamíferos que incluyen al hombre que es inmunizado subsiguientemente con la composición farmacéutica que incluye muchas veces el baculovirus recombinante de la presente invención como principio activo. La composición farmacéutica de la invención, se administra mediante inhalación.

Y, el efecto preventivo sobre la infección puede evaluarse inmunizando después con la composición farmacéutica de la presente invención múltiples veces, administrando el patógeno que va a someterse al vertebrado, particularmente,

al mamífero incluyendo al hombre, y después de transcurrir cierto período, comparando la tasa de supervivencia de los vertebrados particularmente, de los mamíferos que incluyen los seres humanos a los que se administró el baculovirus recombinante, que constituye el principio activo en la composición farmacéutica de la presente invención, con aquellos a los que no se les administró.

(4) Vacuna de esta exposición

El baculovirus recombinante que es el principio activo de la composición farmacéutica de la presente invención, se purifica como la partícula viral que brotó de las células de insectos, incluyendo un producto expresado de la secuencia del ADN de fusión que fusiona el gen que codifica la secuencia aminoácida de la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, al gen extraño inmunogénico que posee loa inmunogenicidad deseada para potenciar el efecto preventivo sobre la infección con el patógeno, exhibiendo la acción para disminuir el título de infectividad. Entonces, se cree que la proteína antigénica extraña que se convirtió en el componente de la partícula vírica, facilita la inmunidad adquirida (inmunidad humoral y celular), administrando la composición farmacéutica a los vertebrados en forma de partícula vírica, particularmente, a los mamíferos incluyendo al hombre, y además la proteína antigénica que constituye el producto expresado de la secuencia del ADN de fusión, lo que facilita posteriormente la inmunicidad humoral y celular adquirida, en las células de vertebrados, particularmente, en las células en los mamíferos incluyendo al hombre. Así el baculovirus recombinante es útil como vacuna.

En particular, esta exposición proporciona la vacuna que incluye al particular baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP como principio activo.

Como ocurre con la composición farmacéutica anterior (3), la vacuna potencia el efecto preventivo sobre la infección y disminuye el título de infectividad (por ejemplo, el título de infectividad vírica) para los organismos patogénicos, tales como el antígeno superficial (CSP) de las superficies esporozoíticas. De este modo, comparando el período y la tasa de supervivencia en los mamíferos infectados, incluyendo al hombre, con aquellos a los que no se administró la composición farmacéutica de la presente invención, la vacuna se muestra particularmente útil como medicamento preventivo o terapéutico paras la infección malárica.

La vacuna de la presente exposición es útil como medicamento preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas y sus complicaciones, causadas por el patógeno, utilizando sus acciones para potenciar el efecto preventivo de la infección sobre el antígeno infeccioso, y disminuir el título de infectividad.

El baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP que constituye el principio activo vacunal, posee acciones que potencian un efecto que previene la infección, sobre el antígeno infeccioso y que disminuye el título de infectividad, pudiéndose utilizar esta acción o actividad para procesos patológicos asociados con la infección de las células o tejidos diana. Dichas células dianas afectadas por la infección, incluyen, por ejemplo, células sanguíneas, y otras células diana incluyen células hepáticas, renales, cerebrales, pulmonares, epiteliales y musculares. Los tejidos que incluyen estas células comprenden los pulmones, hígado, riñón, conductos venosos y arteriales, estómago, intestino, uretra, piel y músculos.

La vacuna como la composición farmacéutica anterior (3), puede prepararse como composición que incluye la cantidad farmacéuticamente efectiva del baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP, y el transportador farmacéuticamente aceptable.

La vacuna puede prepararse en una forma de composición farmacéutica que utiliza el medicamento aceptable con la composición farmacéutica anterior (3), según los procedimientos estándar. El vehículo puede incluir, por ejemplo, soluciones fisiológicamente aceptables tales como las salinas estériles y las salinas tamponadas estériles.

La vacuna (en adelante, la formulación es la misma que en la composición farmacéutica), puede prepararse como una formulación liposómica que incluye al baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP como principio activo, y que puede combinarse como adyuvante. Los ejemplos específicos de la vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención, pueden incluir la formulación liposómica. Ésta puede consistir en una en que el baculovirus recombinante de la presente invención se retenga en el liposoma utilizando fosfolípidos ácidos como componentes de la membrana, o utilizando fosfolípidos neutros o ácidos como componentes membranales.

Los fosfolípidos neutros o ácidos que se utilizan como componentes de la membrana, no están particularmente limitados, pudiéndose utilizar, solo o en mezclas de dos o más, varios lípidos para la formulación liposómica.

Una membrana liposómica se forma según procedimientos estándar, utilizando fosfolípidos ácidos aislados, o combinando los neutros con los ácidos. En el caso de combinar los fosfolípidos neutros, la tasa del fosfolípido ácido que va a combinarse, puede ser de entre 0,1 y 100 mol%, preferentemente de entre 1 y 90 moles%, y más preferentemente, de alrededor de 10-50 moles% en los componentes membranosos liposómicos.

Cuando el liposoma mencionado está preparado, puede añadirse, por ejemplo, colesterol. Éste puede controlar la fluidez de los fosfolípidos y hacer que la preparación de los liposomas sea más fácil. El colesterol se añade

típicamente en una cantidad equivalente a la del fosfolípido, y se añade y combina preferiblemente en una cantidad 0,5 veces equivalente a la del fosfolípido.

En cuanto a la proporción del principio activo y del fosfolípido ácido en la formulación liposómica, la proporción del fosfolípido ácido es de alrededor de 0,5 a 100 equivalentes, preferentemente de entre 1 a 60 equivalentes y más preferentemente de entre 1,5 y 20 equivalentes, con respecto al ingrediente activo.

La cantidad del baculovirus recombinante, que constituye el principio activo que va a utilizarse, puede estar entre un porcentaje de varios moles a un porcentaje de varios décimos, preferentemente entre 5 y 10 moles% y alrededor, típicamente, de 5 mol%.

La producción, la concentración y el control del diámetro de las partículas de la formulación liposómica mencionada, puede llevarse a cabo según los procedimientos estándar. También pueden combinarse, si se desea, con la formulación liposómica, varios aditivos anteriormente descritos. Pueden también unirse a ellos, y utilizarse, ácidos grasos (por ejemplo ácidos behénico, esteárico, palmítico, mirístico, oleico), grupos alquilo, grupos colesterílicos y similares. La producción de la formulación liposómica, preparada uniéndolos, puede llevarse asimismo a cabo según los procedimientos estándar (véase Long Circulating Liposomes: old drugs, New therapeutics., M.C. Woodle, G. Storm, Eds: Springer-Verlag berlin (1998)).

La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención, puede utilizarse preferentemente como una composición vacunal. Cuando se utiliza, es preferible que, para potenciar un efecto anti-infeccioso (antimalárico o antigripal) se combine con el adyuvante, en una cantidad farmacéuticamente efectiva.

Como adyuvante, algunos que se utilizan para este tipo de vacuna, pueden hacerlo sin limitaciones. Como ejemplos suyos, pueden mencionarse el adyuvante completo de Freund, el dipéptido muranilo, hidróxido alumínico, BCG, IL-12, N-acetilmuramina-L-alanil-D-isoglutamina, timosina α1 y QS-21. La cantidad del adyuvante que va a combinarse puede determinarse apropiadamente dependiendo de la blandura o del eritema dérmico, fiebre, dolor de cabeza y dolor muscular que se expresan como parte de la respuesta inmune en el hombre o en el animal después de su administración. La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención, puede combinarse con otros artículos farmacéuticos públicamente conocidos, tales como péptidos facilitantes de la respuesta inmune y agentes antibacterianos (agentes antibacterianos sintéticos).

Unos fármacos opcionales y unos aditivos pueden contenerse ulteriormente en la vacuna (composición farmacéutica). Como ejemplos suyos, puede ponerse el ión, calcio que ayuda a la toma intracelular del baculovirus recombinante. Pueden utilizarse fácilmente los medicamentos y aditivos, por ejemplo, el liposoma, y por ejemplo, el emulsificante fluocarbonado, el cocleato, túbulos, partículas aureas, las microsferas biodegradables y los polímeros catiónicos que llevan a cabo la transfección.

La cantidad del principio activo que se contiene en la vacuna (composición farmacéutica) (formulación) de esta invención, no está particularmente limitada, y puede seleccionarse a partir de un amplio intervalo, siempre que constituya una cantidad farmacéuticamente efectiva. La dosis de la vacuna (composición farmacéutica) no está particularmente limitada, pudiéndose seleccionar apropiadamente en un amplio intervalo, dependiendo del efecto terapéutico limitado, del procedimiento de administración (vía de administración), del período terapéutico, edad y género del paciente, y otras condiciones.

Cuando el baculovirus recombinante que constituye un principio activo vacunal (composición) de la presente invención, se administra al hombre, en términos de las PFU del virus recombinante, se administra por paciente el baculovirus recombinante que corresponde a 10^2-10^{12} PFU, preferentemente 10^5-10^{10} PFU y más preferentemente, 10^6-10^9 PFU.

La dosis del baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP, que es el principio activo de una vacuna (composición farmacéutica) de la invención, se selecciona a partir de un amplio espectro de cantidades, pues la cantidad del ADN que puede expresarse introducida en el huésped vacunal, cantidades que dependen de la cantidad del ADN que puede expresarse que se introducen el huésped vacunal o de la cantidad del ARN trascrito, y también de la intensidad de la transcripción y de los promotores traduccionales que se utilizan por el vector de transferencia.

La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se administra inyectando directamente una suspensión de baculovirus recombinante en la que el vector se ha suspendido en PBS (solución salina tamponada de fosfato), o solución salina, en un sitio local (por ejemplo, en tejido pulmonar, hepático, muscular y cerebral), mediante inhalación a través de la nariz o de las vías aéreas, o administrando el vector en los vasos sanguíneos (por ejemplo, intraarterial, intravenosa, y en la vena portal). La vacuna de la invención se administra preferentemente mediante inhalación.

Resulta preferido que la vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se administre no de una vez, sino en varias ocasiones, observando las condiciones después de la cebadora vez y administrando la vacuna o vacunas adicionales. Esto hace posible potenciar el efecto deseado. Es posible, adicionalmente, llevar a cabo la

inmunización con la composición farmacéutica compuesta del baculovirus recombinante AcNPV-Dual-PfCSP, después de administrar la vacuna (composición farmacéutica). La combinación de las distintas drogas que van a combinarse tiene también la posibilidad de potenciar el efecto terapéutico, mediante la administración de la vacuna (composición farmacéutica).

En una forma de realización de la vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención, el baculovirus recombinante constituye uno de los principios activos de la vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención, y puede formularse mezclando el baculovirus recombinante obtenido mediante recombinación homóloga del vector de transferencia, en el que el gen de fusión obtenido fusionando el gen extraño inmunogénico deseado y el gen que codifica la proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, se introdujo con el ADN baculovírico en la forma que es capaz de inyectar una dosis unitarial (solución, suspensión o emulsión) con el vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, que no es tóxico para los vertebrados, incluyendo al hombre, a la dosis y concentración que va a administrarse, siendo compatible con otros ingredientes en la formulación). Por ejemplo, la formulación no contiene preferentemente antioxidantes u otros compuestos por ser peligrosos para el baculovirus recombinante.

El vehículo contiene apropiadamente los aditivos en cantidades pequeñas, tal como sustancias que aumentan las propiedades isotónicas y la estabilidad química. Dichas sustancias no son tóxicas para los mamíferos, incluyendo al hombre en las dosis y concentraciones con las que van a administrase, pudiendo incluir tampones tales como ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de peso molecular bajo, (por ejemplo, inferior a alrededor de 10 resíduos) (por ejemplo, poliarginina o tripéptido), proteínas (por ejemplo, albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas), aminoácidos, por ejemplo, glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrina), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), alcoholes azucarados (por ejemplo, manitol o sorbitol), contraiones (por ejemplo, sodio) y/o surfactantes no iónicos (por ejemplo, polisorbato, poloxámer).

La vacuna farmacéutica (composición) que incluye el baculovirus recombinante, puede guardarse representativamente en un contenedor mono unitario o de múltiples dosis, por ejemplo, en un vial o ampolla sellados como una solución acuosa, o un producto liofilizado.

La composición farmacéutica que incluye la vacuna (composición) de la presente invención, se administra de un modo idéntico al de las “Prácticas Médicas Correctas”, cuando se considera una situación clínica (por ejemplo, situación que debe prevenirse o tratarse) de un paciente individual, un sitio para la administración de la vacuna (composición) que comprende el baculovirus recombinante, un tejido diana, el procedimiento de administración, un régimen y otros factores conocidos públicamente por los expertos en la técnica. Por tanto, la dosis apropiada de la vacuna (composición) en la presente invención, se determina considerando lo que se ha manifestado.

Ejemplos

Esta exposición se describirá a continuación con mayor detalle haciendo referencia a los Ejemplos. Éstos son sólo ejemplos y no limitan la presente invención.

[Ejemplo 1] Vector de transferencia plasmídico y procedimiento para su obtención

(1) Construcción del vector de transferencia plasmídico pTriEx-Hsp65-gp64

(1.1) Construcción del plásmido pBACsurf-CSP

Se obtuvo un plásmido pcADN-CS87 consiguiendo un fragmento NheI-NotI que incluía el ADN genómico secuencial de fusión a partir de la cepa ANKA de *Plasmodium berghei*, una secuencia señal de la secreción Igk murina, y una secuencia FLAG, según el procedimiento de Yoshida y colaboradores (Yoshida, S., et al., B.B.R.C., 271, 107-115(2000)), e insertando el fragmento NheI-NotI en un sitio NheI-NotI de pcADN3.1 (proporcionado por Invitrogen).

Se recogió una muestra sanguínea de ratones BALB/c infectados con el parásito malarial *P. berghei* ANKA, extrayéndose el ADN genómico *P. berghei* utilizando el Equipo QIAamp ADN Midi (proporcionado por Qiagen). A continuación, el ADN genómico de *P. berghei* ANKA se amplificó mediante PCR, utilizando un cebador pbCSP1:

5’-GGAGGGCTAGC*ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG GGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC*GCGGATCCACTGCAGGACTACAAGGACGTAGACAAGGGATATGGACAAA ATAAAGCATCCAAGCCC-3 (SEC ID nº: 1), en el que se representa subrayado un sitio NheI recién formado, representándose la secuencia señal de la secreción Igk murina mediante cursiva, y la secuencia FLAG mediante un subrayado doble, y PbCSP-R1:

GGAGGGCGGCCGCATCCCGGGTTTTCTTATTTGAACCTTTTCGTTTTCTAACTCTTATACCAGAACC-3’ (SEC ID nº: 2) (representándose un sitio NotI recién formado mediante el subrayado). La PCR se llevó a cabo

utilizando la polimerasa PfuADN (proporcionada por Stratagene) mediante 30 ciclos (desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos, hibridización a 55ºC durante 1 minuto y alargamiento a 72ºC durante 2 minutos). El producto PCR no contiene un anclaje glicosil fosfatidol inositor (GPI), y codifica PbCSP fusionado con la secuencia señal de la secreción Igk murina, en lugar de su secuencia señal original.

El producto PCR se purificó, se fragmentó con enzimas de restricción NheI/NotI, insertándose entonces en los sitios NheI/NotI de pcADN3.1 (proporcionado por Invitrogen), designándose como pcADN-CS87 el plásmido resultante. Éste contiene un promotor CMV, la secuencia señal de la secreción Igk, una proteína (que corresponde a 21-299 aminoácidos), codificada por el gen PbCSP, una señal poly A derivada de un gen de la hormona bovina de crecimiento y una secuencia poly A.

Un fragmento génico que codifica una secuencia aminoácida en posiciones 21 a 306 de un péptido de PbCSP, se obtuvo fragmentando pcADN-CS87 con los enzimas de restricción PstI y SmaI, insertándose el fragmento de ADN en los sitios Pis y SmaI de pBACsurf (proporcionado por Novagen), designándose el plásmido obtenido como pBACsurf-CSP.

(1.2) Construcción del plásmido pBACsurf-Hsp65

El gen Hsp65 se obtuvo extrayendo ADN genómico de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv utilizando el equipo QIAamp ADN Midi (proporcionado por Qiagen), clonándose mediante PCR. Es decir, el ADN genómico extraído de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, se amplificó mediante PCR, utilizando un cebador, phsp65-F1:

5'-AATAATAGATCTAATGGCCAAGACAATTGCGTACGACGAAGA-3 (SEC ID nº: 3) (representándose un sitio Bg1II por el subrayado) y phsp65-R1:

AATCCAATGCGGCCGCGGGAATTCGATTCCTGCAGGTCAGAAATCCATGCCACCCATGTCGCC-3 (SEC ID nº: 4), (representándose el sitio NotI por el subrayado).

Se purificó el producto PCR, se fragmentó con los enzimas de restricción Bg1II/NotI, se unió a los sitios BamHI/NotI en pCADN3.1(proporcionado por Invitrogen), designándose el plásmido resultante pcADN-hsp65.

El plásmido pcADN-hsp65 es un constructo en el que la secuencia señal de la secreción Igk murina, se fusionó al gen hsp65.

Se llevó a cabo la PCR con pcADN-hsp65 como matriz, utilizando el cebador phsp65-F2:

5'-CACCCCTGCAGG*ACTACAAGGACGACGATGACAAG*GAATTCATGGCCAAGACAATTGCGTACGACGAAGAG GCC-3' (SEC ID nº: 5) (Sse8387I, los sitios EcoRI están representados por los subrayados, y la secuencia FLAG, se representa mediante cursiva) y phso65-R2:

5'-CCCGGGCGAAATCCATGCCACCCATGTCGCCGCCACC-3' (SEC ID nº: 6) (un sitio Cfr9I se representa por un subrayado). El fragmento de ADN génico Hsp65 resultante (de alrededor de 1660 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), y fragmentado subsiguientemente con Sse8387I/Cfr9I, que se insertó entonces en los sitios PstI/Cfr9I de pBACsurf-CSP (Yoshida et al. Virology 316: 161-70, 2003) obtenidos anteriormente.

El plásmido construido como antes, se denominó como pBACsurf-Hsp65.

(1.3) Construcción del plásmido pENTR-gp64

La PCR se realizó con pBACsurf-1 (proporcionado por Novagen) como matriz utilizando el cebador pool-F2:

5'-CACCCGGACCGGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAG-3' (SEC ID nº: 7) (RsrII representándose por el subrayado) y pgp64-R2: 5'-GGTACCATATTGTCTATTACGGTTTCTAATCATAC-3' (SEC ID nº: 8) (un sitio KpnI está representado por el subrayado). El fragmento de ADN del gen gp64 resultante (alrededor de 1700 pares de bases), se insertó en pENTR/D-TOPO para construir el plásmido pENTR-gp64.

El plásmido construido como anteriormente se denominó pENTR-gp64.

(1.4) Construcción del vector de transferencia pDual-Hsp65-gp64

pDual-Hsp65-gp64 se fragmento con PstI/Cfr9I y el fragmento del ADN del gen hsp65 (de alrededor de 1660 pares de bases), se insertó en los sitios PstI/Cfr9I de pENTR-gp64 para construir el plásmido pENTR-Hsp65-gp64.

Además, pENTR-hsp65-gp64 se fragmentó con RsrII/KpnI y un fragmento de ADN (de alrededor de 3360 pares de

bases) compuesto de un promotor polihedrímico y del gen hsp65gp64 se insertó en RsrII/kpnI de TriEx-3 (proporcionado por Novagen), para construir el vector de transferencia plasmídico pDual-Hsp65-gp64, en el que la expresión se controló mediante el promotor dual deseado.

(2) Construcción del vector de transferencia pDual-PbCSP-gp64

El plásmido pBACsurf-CSP obtenido en (1.1.1), se fragmentó con PstI/Cfr9I, y un fragmento de ADN del gen PbCSP (de alrededor de 890 pares de bases), se insertó en los sitios PstI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64, para construir el plásmido pDual-PbCSP-gp64.

(3) Construcción del vector de transferencia pDual-H1N1/HA1-gp64

Se extrajo ARN a partir de un sobrenadante del cultivo de células MDCK infectadas con la cepa PR8/34 del de la gripe, utilizando el Equipo QIAamp MiniElute Virus Spin de (QIAGEN), amplificándose mediante RT-PCR empleándose el cebador HA-f: 5'-CCTGCAGGTATGAAGGCAAACCTACTGGTC-3' (SEC ID nº: 9) (un sitio SbfI se representa por el subrayado, y HA-r: 5'-GCCCGGGCGATGCATATTCTGCA-3 (SEC ID nº: 10) (un sitio SbfI se representa por el subrayado). El fragmento génico HA del virus de la gripe, con una longitud total de 1700 pares de bases, se clonó en II-TOPO con PCR-Blunt (proporcionado por Invitrogen).

El plásmido resultante se designó como pCR-Blunt-HA. La PCR se llevó a cabo con PCR-Blunt-HA como matriz, utilizando el cebador pHA-F1: 5'-CACCGAATTCGACACAATATGTATAGGCTACCATGCG-3' (SEC ID nº: 11) (un sitio EcoRI se representa mediante el subrayado) y pHA-R1: 5'-CCCGGGCACCTCTGGATTGGATGGACGGAATG-3' (SEC ID nº: 12) (un sitio Cfr9I se representa por el subrayado). El fragmento del ADN génico resultante H1N1/HA1 (de alrededor de 1000 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), fragmentado subsiguientemente con EcoRI/Cfr9I, que se insertó entonces en los sitios EcoRI/Cfr9I del pDual-Hsp65-gp64, para construir el plásmido pDual-H1N1/HA1-gp64.

(4) Construcción del vector de transferencia pDual-PbTRAMP-gp64

La muestra sanguínea se recogió de un ratón BALB/c infectado con el parásito de la malaria *P. berghei* ANKA, extrayéndose genómico de *P. berghei* utilizando el Equipo QIAamp ADN Midi (proporcionado por Qiagen).

Se clonó un gen PbTRAMP mediante PCR con este ADN genómico como matriz según el procedimiento siguiente. Es decir, la PCR se llevó a cabo utilizando el cebador pTRAMP-F1: 5'-CACCGAATTCAAAATTGATACGAAAAAAAATGAAG-3' (SEC ID nº: 13) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado), y pTRAMP-R1: CCCGGGCTTTAATTTTGAGGAGTCTTTATTTTC-3' (SEC ID nº: 14) (el sitio Cfr9I está representado por el subrayado). El fragmento de ADN PbTRAMP resultante (de alrededor de 800 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), y se fragmentó a continuación con EcoRI/cfr9I, que se insertó entonces en los sitios EcpRI/Cfr9I de pBACsurf-Hsp65. El plásmido construido se denominó pBACsurf-PbTRAMP.

A continuación el pBACsurf-PbTRAMP se fragmentó con EcoRI/Cfr9I, insertándose un fragmento de ADN del gen PbTRAMP (de alrededor de 860 pares de bases) en los sitios EcoRI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64, para construir el plásmido pDual-PbTRAMP-gp64.

(5) Construcción del vector de transferencia pDual-PbAMA1D123-gp64

La muestra sanguínea se recogió del ratón BALB/c infectado con el parásito de la malaria *P. berghei* ANKA, estrayéndose el ADN genómico de *P. berghei* utilizando el Equipo QIAamp ADN Midi (proporcionado por Qiagen).

Un dominio 123 (D123) del gen PbAMA1 se clonó mediante PCR con este ADN genómico como matriz, según el procedimiento siguiente. Es decir, la PCR se llevó a cabo utilizando el cebador pAMA-F1: 5'-CACCGAATTCAATCCATGGGAAAAGTATACGGAAAAATAT-3' (SEC ID nº: 15) (estando representado el sitio EcoRI por el subrayado), y pAMA-R1: 5'-CCCGGGCTTCTCTGGTTTGATGGGCTTTCATATGCAC-3' (SEC ID nº: 16) (estando representado el sitio Cfr9I por el subrayado). El fragmento de ADN PbAMA1D123 resultante (de alrededor de 1280 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), fragmentándose a continuación con EcoRI/Cfr9I, que se insertó entonces en los sitios EcoRI/Cfr9I de pBACsurf-Hsp65. El plásmido construido se denominó pBACsurf-PbAMA1D123.

A continuación, pBAC-surf-PbAMA1D123, se fragmentó con EcoRI/Cfr9I y el fragmento de ADN del gen PbAMA1D123 (de alrededor de 1280 pares de bases), se insertó en los sitios EcoRI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64 obtenido en el apartado anterior (1.4), para construir el plásmido pDual-PbAMA1D123-gp64.

(6) Construcción del vector de transferencia pDual-PbMSP119-gp64

La muestra sanguínea se recogió del ratón BALB/c infectado con el parásito de la malaria *P. berghei* ANKA,

extrayéndose el ADN genómico *P.berghei* utilizando el Equipo QIAamp ADN Midi (proporcionado por Qiagen).

Se clonó un gen PbMSP119 mediante PCR con este ADN genómico como matriz, según el procedimiento siguiente. Es decir, la PCR se llevó a cabo utilizando el cebador pMsp1-F1: 5' CACCCTGCAGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCACATAGCCTCAATAGC TTTAAATAACTTAAATAAATCTGG-3' (estando representado el sitio PstI por el subrayado), y pMsp1-R1: 5'-CCCGGGTTCCCATAAAGCTGGAAGAGCTACAGAATACACC-3' (SEC ID nº: 18) (estando el sitio Cfr9I representado por el subrayado). El fragmento de ADN PbMSP119 resultando (de alrededor de 450 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), y fragmentándose con PstI/Cfr9I a continuación, que se insertó entonces en los sitios PstI/Cfr9I de pBACsurf-Hsp65. El plásmido construido se denominó pBACsurf-PbMSP119.

A continuación, pBACsurf-PbMSP119 se fragmentó con PstI/Cfr9I, y el fragmento de ADN del gen PbMSP-119 (de alrededor de 450 pares de bases), se insertó en los sitios PstI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64, para construir el plásmido pDual-PbMSP-119-gp64.

(7) Construcción del vector de transferencia pDual-PfCSP-gp64

El ADN genómico del parásito *P. falciparum* de la malaria, se extrajo de los hematíes humanos infectados con la cepa 3D7 de *P. falciparum*, utilizando el equipo QIAamp ADN Midi (QIAGEN). Se clonó un gen PfCSP mediante PCR con este ADN genómico como matriz, según el procedimiento siguiente: Es decir, se realizó la PCR utilizando el cebador pPfCSP-F1: 5'-CACCGAATTCTTATTCCAGGAATACCAGTGCTATG GAAGT-3' (SEC ID nº: 19) (representándose el sitio EcoRI por el subrayado), y pPfCSP-R1: 5' CCCGGGCTTTTTCCATTTTACAAA TTTTTTTTTC-3' (SEC ID nº 20) (representándose Cfr9I por el subrayado). El fragmento ADN PfCSP resultante (de alrededor de 1100 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), fragmentándose a continuación con EcoRI/Cfr9I, que se insertó entonces en los sitios EcoRI/Cfr9I de pDual –PbAMA1D123-gp64. El plásmido construido se denominó pDual-PfCSP-gp64.

(8) Construcción del vector de transferencia pDual-PfAMA1-gp64

El ADN genómico del parásito *P. falciparum* de la malaria, se extrajo de los hematíes humanos infectados con la cepa 3D7de *P. falciparum*, utilizando el Equipo QIAamp ADN Midi (QIAGEN). El gen PfAMA1 se clonó mediante PCR con este ADN genómico como matriz, según el procedimiento siguiente, es decir, la PCR se llevó a cabo utilizando el cebador pPfAMA1-F1: 5'-CACCCTGCAG*GACTACAAGGACGACGATGACAAG*CAGAATTATTGGGAACATCCATATCAAAATAGTGATGTG-3' (SEC ID nº 21) (estando representado el sitio PstI por el subrayado, y la secuencia FLAG por cursiva), y pPfAMA1-R1: 5'CCCGGGCTTTCA TTTTATCATAAGTTGGTTTATG-3' (SEC ID nº 22) (el sitio Cfr9I estando representado por el subrayado). El fragmento de ADN PfAMA1 resultante de alrededor de (3500 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), fragmentándose a continuación con PstI/Cfr9I, que se insertó entonces en los sitios PstI/Cfr9I de PbAMA1D123-gp64. El plásmido construido se denominó pDual-PfAMA1-gp64.
mva

(9) Construcción del vector de transferencia pDual-Pfs25-gp64

El ADN genómico del parásito de la malaria *P. falciparum*, se extrajo de hematíes humanos infectados con la cepa 3D7 del mismo utilizando el Equipo QIAamp ADN Midi (QIAGEN). El gen Pfs25 se clonó mediante PCR con este ADN genómico como matriz según el procedimiento siguiente, es decir, se llevó a cabo la PCR utilizando el cebador pPfs25-F1: 5'-CACCGAATTCAAAGTTACCGTGGATACTGTATGCAAAAGAGGA-3' (SEC ID nº: 22) (representándose el sitio EcoRI mediante subrayado), y pPfs25-R1: 5'-CCCGGGCAGTACATATAGAGCTTTCATTATCTAT-3' (SEC ID nº 24) (representándose el sitio Cfr9I mediante subrayado). El fragmento de ADN resultante Pfs25 (de alrededor de 530 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (proporcionado por Invitrogen), fragmentándose seguidamente con EcoRI/Cfr9I, que se insertó entonces en los sitios EcoRI/Cfr9I de PbAMA1D123-gp64. El plásmido construido se designó como pDual-Pfs25-gp64.

(10) Construcción del vector de transferencia pDual-H5N1/HA1-gp64

Se sintetizó un gen HA1 a partir del virus H5N1 de la gripe de las aves y se insertó en los sitios EcoRI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64 para construir el plásmido pDual-H5N1/HA1-gp64.

(11) Construcción del vector de transferencia pDual-SARS/S-gp64

Un gen S del virus SARS se sintetizó, y se insertó en los sitios EcoRI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64, para construir el plásmido pDual-SARS/S-gp64.

(12) Construcción del vector de transferencia pCP-H1N1/HA1-gp64

Se llevó a cabo la PCR con pCR-Blunt-HA como la matriz que utilizaba Polh-f RsrII (5'-

GGGCGGACCGGATAATTAAAATGATAACCATCTCG-3' (SEC ID nº: 25) (representándose el sitio RsrII por el subrayado) y GP64-r DraIII (5'-GGGCACTTAGTGATATTGTCTATTACGGTTTCTAATC-3' (SEC ID nº: 26) (representándose el sitio DraIII por el subrayado). Un fragmento resultante de ADN de 2700 pares de bases, se unió a un vector obtenido sometiendo a digestión el pDual-H1N1/HA1-gp64 con los enzimas de restricción RsrII y DraIII para construir pCP-H1N1/HA1-gp64.

(13) Construcción del vector de transferencia pCAP-H1N1/HA1-gp64

HA1 obtenido fragmentando pCP-H1N1/HA1-gp64 con los enzimas de restricción RsrII y DraIII y un fragmento génico gp64, se insertaron en el vector obtenido fragmentando pTriEx-1.1 (proporcionado por Novagen) con los enzimas de restricción RsrII y DraIII, para construir un plásmido pCAP-H1N1/HA1-gp64.

(14) Construcción del vector de transferencia pCU-H1N1/HA1-gp64

Se llevó a cabo la PCR con pTriEx3.1 como matriz, utilizando CMVenh-f FseI (5'-GGGGGCCGGCCCTAGTTATTAA TAGTAATCAATTAC-3': SEC ID nº: 27) (el sitio FseI está representando por el subrayado) y CMVenh-r KpnI (5'-GGGGGTACCCATGGTAATAGCGATGACTAATACG-3': SEC ID nº: 28) (el sitio KpnI está representando por el subrayado), para amplificar una región CMV potenciadora. Además, la PCR se realizó con ADN genómico humano como matriz, utilizando UBBp-f KpnI (5'-GGGGGTACCTCGAGGAAGGTTTCTTCAACTC-3': SEC ID. Nº: 29) (el sitio KpnI está representando por el subrayado) y UBBp-r RsrII (5'-GGGCGGTCCGGACCTAGTTTAAAAGTAAAACATAAG-3': SEC ID nº: 30) (el sitio RsrII está representado por el subrayado), para amplificar una región promotora UBB. Los dos fragmentos resultantes se unieron al vector obtenido realizando la digestión pCP-H1N1/HA1-gp64 con los enzimas de restricción FseI y RsrII para construir pCU-H1N1/HA1-gp64.

(15) Construcción de un vector de transferencia pDual-H1N1/NP-gp64

Se realizó la RT-PCR con ARN genómico de la cepa PR8/34 del virus de la gripe, como matriz, utilizando NP-f EcoRI (5'-ACGGAATTCCATTCAATTCAAACTGGA-3': SEC ID nº 31) (el sitio EcoRI se representa por el subrayado) y NP-r Cfr9I (5'-GATCCCGGGCCTTGTCAATGCTGAATGGCAA-3': SEC ID nº 32) (el sitio Cfr9I se representa por el subrayado). Se sometió a digestión un fragmento resultante con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, que se insertó en pCP-H1N1/HA1-gp64 digiriéndose en los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, para obtener pDual-H1N1/NAe-gp64.

(16) Construcción del vector de transferencia pDual-H1N1/M2-gp64

La RT-PCR se llevó a cabo con ARN genómico de la cepa PR8/34 del virus de la gripe como matriz, utilizando M2-f EcoRI (5'-CGGAATTCATGAGTCTTCTAACCGAGG-3': SEC ID nº 33) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado), y M2-r Cfr9I (5'-GATCCCGGGCCTCCAGCTCTATGCTGAC-3':SEC ID nº: 34) (el sitio Cfr9I está representado por el subrayado). Se sometió a digestión con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I un fragmento resultante insertándose en pCP-H1N1/HA1-gp64 digerido con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, para obtener pDual-H1N1/M2-gp64.

(17) Construcción del vector de transferencia pDual-H1N1/NAe-gp64

Se realizó la RT-PCR con ARN genómico de la cepa PR8/34 del virus de la gripe como matriz, utilizando NAe-f EcoRI (5'-ACGGAATTCCATTCAATTCAAACTGGA-3': SEC ID nº: 35) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado) y NAe-r Cfr9I (5'-GATCCCGGGCCTTGTCAATGCTGAATGGCAA-3': SEC ID nº: 36) (el sitio Cfr9I está representado por el subrayado). Se sometió a digestión el fragmento resultante con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I insertándose en pCP-H1N1/HA1-gp64, digiriéndose con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, para obtener pDual-H1N1/NAe-gp64.

(18) Construcción del vector de transferencia pDual-M2e-gp64

se realizó la PCR con pDual-H1N1/M2-gp64 como matriz, utilizando M2-f EcoRI (5'-CGGAATTCATGAGTCTTCTAACCGAGG-3': SEC ID nº: 37) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado) y M2e-r Cfr9I (5'-GATCCCGGGCATCACTTGAACCGTTGCA-3': SEC ID nº: 38) (el sitio Cfr9I está representado por el subrayado). Un fragmento resultante se sometió a digestión con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, y se insertó en pCP-H1N1/HA1-gp64, digerido con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, para obtener pDual-M2e-gp64.

(19) Construcción del vector de transferencia pCP-HA1/NC99-gp64

Se extrajo ARN de un conjunto almacenado y congelado de virus de la gripe NewCaledonia99/20 (NC99), utilizando el Equipo QIAamp MiniElute Virus Spin (QIAGEN), llevándose a cabo la RT-PCR utilizando los cebadores HA1-f y EcoRI (5'-GATGAATTCGACACAATATGTATAGGCTACC-3: SEC ID nº: 39) (representándose el sitio EcoRI por el

subrayado) y HA1-r CFr9I (NC99) (5'-GATCCCGGGCTCTGGATTGAATGGATGGGATG-3': SEC ID nº: 40) (representándose el sitio Cfr9I por el subrayado) por amplifivar un fragmento del gen HA1. Un fragmento resultante y pCP-H1N1/HA1-gp64 se trataron con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, para insertar nuevamente el fragmento génico HA1 derivado de NC99 en una región HA1 introductoria de pCP-H1N1/HA1-gp64. Se designó un plásmido resultante como pCP-HA1/NC99-gp64.

(20) Construcción del vector de transferencia pCP-H1N1/HA0-gp64

La PCR se llevó a cabo con un compuesto pCR-unión roma HA como la matriz, utilizando HA0-f EcoRI (5'GGGGAATTCATGAAGGCAAACCTACTGG-3': SEC ID nº 41) (el sitio EcoRI se representa por el subrayado) y HA2-r Cfr9I (5'-GATCCCGGGCGATGCATATTCTGCA-3': SEC ID nº: 42) (el sitio Cfr9I está representado mediante el subrayado), para amplificar el gen HA completo. Un fragmento resultante y pCP-H1N1/HA1-gp64 se trataron con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I para insertar el nuevo fragmento génico HA0 en la región introductoria de HA1 de pCP-H1N1/HA1-gp64. Un plásmido resultante se denominó como pCP-H1N1/HA0-gp64.

(21) Construcción del vector de transferencia pCP-H1N1/HA2-gp64

La PCR se realizó con un compuesto pCR-Unión roma-HA como la matriz, utilizando HA2-f EcoRI (5'-GATGAATTCATATTTGGAGCCATTGCCG-3': SEC ID nº: 43) (representñandose el sitio EcoRI por el subrayado) y HA2-r Cfr9I (5'-GATCCCGGGCGATGCATATTCTGCA-3': SEC ID nº: 44) (representándose el sitio Cfr9I por el subrayado) para amplificar el gen HA completo. Un fragmento resultante y pCP-H1N1/HA1-gp64 se trataron con los enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I para insertar nuevamente el fragmento génico HA2 en la región HA1 introductora de pCP-H1N1/HA1-gp64. Se designó un plásmido resultante como pCP-H1N1/HA2-gp64.

(22) Construcción del vector de transferencia pCP-H1N1/HA1-vp39

La PCR se llevó a cabo con el ADN del baculovirus unido al Equipo de Transfección BacVector-2000 (Novagen) como matriz, utilizando vp39 (5'-CTTACTAGTATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGAATTCGGCGGCGGCGGCTCGGCGCTAGTGCCCGTGGGT-3': SEC ID nº: 45) (el sitio SpeI está representado por el subrayado y el sitio EcoRI está representado por el doble subrayado), y vp39-r (5'-CTTCACTTAGTGATGGTGATGATGGTGGTGCCCGGGGCTTTAAAGCTTGACGGCTATTCCTCCACC-3': SEC ID nº: 46) (el sitio DraIII está representado por el subrayado y el SmaI está representado por el doble subrayado), para amplificar una región génica vp39. Un fragmento amplificado y la pDual-H1N1/HA1-gp64 se fragmentaron con los enzimas de restricción SpeI y DraIII, y se unieron entre ellos para construir pDual-vp39. Además, la PCR se llevó a cabo con pDual-H1N1/HA1-gp64 como matriz, utilizando Polh-S1 (5'-GCTAACCATGTTCATGCC-3':SEC ID nº: 47) y HA1-r EcoRI (5'-GGGGAATTCACCTCTGGATTGGATGGAC-3': SEC ID nº: 48) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado). Un fragmento resultante se sometió a digestión con EcoRI para preparar el gen HA-1. Se insertó el fragmento resultante en pDual-vp39 y se sometió a digestión con EcoRI para construir pCP-H1N1/HA1-vp39.

(23) Construcción del vector de transferencia pCP-H1N1/NP-vp39 de la presente invención

Se llevó a cabo la PCR con pDual-H1N1/NP-gp64 como matriz, utilizando NP-f 5EcoRI (5'-ACGGAATTCATGGCGTCCCAAGGCACC-3': SEC ID nº: 49) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado) y NP-r EcoRI (5'-ACGGAATTCATTGTCGTACTCCTCTGCATTG-3': SEC ID nº: 50) (el sitio EcoRI está representado por el subrayado). Un fragmento resultante se sometió a digestión con EcoRI. Se insertó un fragmento resultante en pDual-vp39, digerido con EcoRI para construir pCP1-H1N1/NP-vp39.

[Ejemplo 1 de referencia]. Construcción de pBACgus-CMV-PbCSP

(1.1) Construcción de pcADN-GL3 (luc)

El potenciador pGL3-Enhancer (Promega), se fragmentó con los enzimas de restricción HindIII/XbaI, y un fragmento de ADN del gen de la luciferaza (de alrededor de 1690 pares de bases), se unió a los sitios HindIII/XbaI de pcADN3.1 (proporcionado por Invitrogen), y el plásmido resultante se designó pcADN-GL3 (luc).

(1.2) Construcción de pBACgus-CMV-IgHsp65

pcADN-hsp65 obtenido en el Ejemplo 1 (1.2) anterior, se fragmentó con los enzimas de restricción BamHI/NotI, insertándose en los sitios BamHI/NotI para producir pcADN-Ighsp65. El plásmido resultante se denominó como pcADN-IgHsp65.

A continuación el pcADN-IgHsp65 se fragmentó con BglII/SphI y un gen cassette (de alrededor de 2850 pares de bases), compuesto del promotor CMV, del gen Hsp65 transportando la secuencia señal Igk murina, y la señal poly A derivada de la hormona de crecimiento bovina, se insertó en los sitios BglII/SphI de pBACgus-1 (Novagen). El plásmido construido se denominó como pBACgus-CMV-Hsp65.

(1.3) Construcción de pBACgus-CMV-GL3

El plásmido pcADN-GL3 (luc) obtenido anteriormente se fragmentó con los enzimas de restricción NheI/XbaI, insertándose el fragmento de ADN del gen de la luciferaza (de alrededor de 1690 pares de bases) en los sitios NheI/XbaI del plásmido pBACgus-CMV-Hsp65, denominándose el plásmido resultante como pBACgus-CMV-GL3.

(1.4) Construcción de pBACgus-CMV-PbCSP

Un fragmento génico codificando la secuencia correspondiente a las posiciones 21-306 del péptido PbCSP, se obtuvo fragmentando el plásmido pBACsurf-CSP con los enzimas de restricción PstI y SmaI, insertándose el fragmento de ADN (de alrededor de 858 pares de bases) en los sitios PstI y SmaI de pBACgus-CMV-GL3 obtenido anteriormente, designándose el plásmido resultante como pBACgus-CMV-PbCSP.

(1.5) Construcción de pBACgus-CMV-HA-full

El PCR-Blunt-HA se fragmentó con BamHI/Sse8387I y un fragmento de ADN del gen HA (de alrededor de 1750 pares de bases), se insertó en el sitio BamHI/PstI de pBluescript II (KS-), para construir el plásmido pBluescript-HA.

Además, pBluescript-HA se fragmentó con HindIII/XbaI y el fragmento de ADN del gen HA (de alrededor de 1800 pares de bases), se insertó en los sitios HindIII/XbaI de pBACgus-CMV-GL3 obtenido en (1.3), para construir el plásmido pBACgus-CMV-HA-full completo.

[Ejemplo 2]. Baculovirus recombinante y procedimiento para su obtención

(1) El baculovirus recombinante se obtuvo utilizando el Equipo de transfección (BacVector-2000 proporcionado por Novagen), para obtener el baculovirus recombinante, co-transfectando el BacVector-2000 ADN con cada uno de los vectores de transfección: pDual-Hsp65-gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP-119-gp64, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64, pDual-Pfs25-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64m, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-M2e-gp64, pCP-HA1/NC99-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1-vp39, pCP-H1N1/NP-vp39 construidos en el Ejemplo 1 anterior, y los plásmidos pBACgus-CMV-PbCS y pBACgus-CMV-HA-full obtenidos en el Ejemplo 1 de Referencia, en las células Sf-9.

Los baculovirus recombinantes obtenidos, se denominaron respectivamente, AcNPV-Dual-Hsp65, AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PbTRAMP, AcNPV-Dual-PbAMA1D123, AcNPV-Dual-PbMSP-119, AcNPV-CMV, PbCSP, AcNPV-CMV-HA-full, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

Las células Sf-9 se cultivaron de forma que se convirtieran en 2 x 10^7 células por placa de 150 mm por cultivo (sumilon proporcionado por Akita Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), y dicho baculovirus descrito antes, se sometió a multiplicidad infecciosa de alrededor de 5. Después de 5 a 6 días, se centrífugo el medio a 10.000 xg a 4ºC durante 25 minutos para recuperar un sobrenadante, que se centrífugo posteriormente utilizando una ultracentrífuga Beckman (rotor de rotación SW28) a 25.000 rpm a 4ºC durante 90 minutos, para producir las partículas víricas.

(2) El baculovirus recombinante se produjo utilizando el Equipo de transfección BacVector-2000 proporcionado por Novagen, para co-transfectar el BacVector-2000 ADN con cada uno de los vectores de transfección: pDual-H5N1/HA1-gp64 y pDual-SARS/S-gp64, construidos en el Ejemplo 1 anterior, en las células Sf-9. Los baculovirus recombinantes que se van a obtener se denominan como AcNPV-H5N1/HA1 y AcNPV-Dual-SARS/S respectivamente.

Las células Sf-9 se cultivaron de forma que se convirtieran en 2 x 10^7 células por placa de 150 mm por cultivo (sumilon proporcionado por Akita Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), y dicho baculovirus descrito antes, se sometió a multiplicidad infecciosa de alrededor de 5. Después de 5 a 6 días, se centrífugo el medio a 10.000 xg a 4ºC durante 25 minutos para recuperar un sobrenadante, que se centrífugo posteriormente utilizando una ultracentrífuga Beckman (rotor de rotación SW28) a 25.000 rpm a 4ºC durante 90 minutos, para producir las partículas víricas.

[Ejemplo 3]. Ensayo del efecto farmacológico del baculovirus recombinante

(Ensayo del efecto farmacológico como vacuna de la malaria).

(Ensayo de prevención de la infección malárica).

3. Procedimientos experimentales

3.1. Inoculación de la vacuna

Se inoculó a ratas hembra BALB/c una solución del virus recombinante para la vacuna, tres veces a intervalos de tres semanas. En el caso de inyección en el músculo, la cantidad fue de 0,2 ml/corporal, preparándose la solución vírica de forma que la cantidad de virus fue de 5 x 10^6 pfu/organismo.

3.2. Infección de los ratones con la malaria

Los ratones en cada grupo fueron anestesiados con una solución anestésica para ratones, 3 semanas después de la tercera inoculación vacunal, y se infectaron con malaria, utilizando una cepa de *Anopheles stephensi* SDA 500 infectada con una picadura de 2,34 clones de Plasmodium berghei ANKA en los ratones.

3.3. Cálculo de la tasa de supervivencia de los ratones en cada grupo

Después de la infección malárica, los casos mortales en cada grupo se contaron, evaluándose la tasa de supervivencia de cada grupo en los ratones.

3.4. Para el efecto preventivo de la infección malárica, de la composición farmacéutica de la presente invención como vacuna, los resultados del ensayo del efecto farmacológico, se muestran en la Tabla 1. La tasa de supervivencia en cada grupo se muestra en la columna derecha en la Tabla 1.

Tal como se muestra en la Tabla 1, todos los ratones en los que los hematíes infectados con malaria en la sangre periférica se habían identificado murieron a los 38 días después de la infección. Entre los virus recombinantes en los que el gen antigénico (CSP) en la fase esporozoítica se había insertado, en el grupo (grupo Nº 4) en el que el baculovirus recombinante (Ejemplo 1 (2)) que contenía el vector de transferencia: AcNPV-Dual-PbCSP obtenido en el Ejemplo 2 se había inoculado intramuscularmente, se observó el 100% del efecto preventivo de la infección.

En el baculovirus de tipo salvaje (grupo Nº 2), no se observó diferencia con el grupo control (grupo Nº 1). En el grupo (grupo Nº 3) en el que el baculovirus recombinante obtenido en el Ejemplo 2 utilizando el promotor de mamíferos (AcNPV-CMV-PbCSP, incluyendo el vector en el Ejemplo 1 de referencia) que se había incluido, se observó una tasa de supervivencia ligeramente más alta, comparada con el grupo de control, sugiriendo la probabilidad de que el efecto debido a la inoculación vírica apareciera, aunque fuera débil.

Tabla 1

Tras la supervivencia de los ratones en cada grupo

Grupo Nº	Supervivencia/casos	Tasa de supervivencia (%)
1 Ninguno	5/20	25
2 AcNPV-WT	6/20	30
3 AcNPV-CMV-PbCSP	5/10	50
4 AcNPV-Dual-PbCSP	10/10	100

[Ejemplo 4]. Ensayo del efecto farmacológico del baculovirus recombinante.

(Ensayo del efecto farmacológico como vacuna del virus de la gripe)

(Ensayo de prevención de la infección por virus de la gripe)

4. Métodos experimentales

4.1. Vacuna

Una solución vírica vacunal se inoculó dos veces a intervalos de 2 semanas. El virus vacunal se inyectó a $10^{6,5}$ PFU por ratón en los músculos de la pantorrilla utilizando una jeringuilla con 26G para inyección insulínica.

4.2. Preparación de la solución vírica para la inducción

En un día habitual de la infección con el virus de la gripe, una solución vírica almacenada de la cepa A/PR/8/34 del virus de la gripe, se descongeló de forma natural a temperatura ambiente. La solución vírica almacenada y descongelada, se diluyó a 1000 $TCID_{50}$/0,05 mL para infecciones del tracto respiratorio inferior y a 1000 $TCID_{50}$/0,005 mL para las infecciones del tracto respiratorio superior, utilizando una solución salina tamponada fosfatada de Dulbecco, (D-PBS) que contenía BSA (albúmina sérica bovina) estéril al 10%, para conseguir la solución vírica para la inducción.

4.3.Inoculación intranasal de la solución vírica

Dos semanas después de la segunda inoculación vacunal, se anestesiaron intramuscularmente los ratones, administrando 0,05 ml de la solución anestésica por ratón. La solución del virus de la gripe obtenida en 4.2, se inoculó en la nariz de los ratones a 0,005 ml para la infección del tracto respiratorio superior o a 0,05 para la infección del tracto respiratorio inferior.

4.4. Muestreo de los pulmones

Tres días después de la inoculación vírica 0,1 mL por ratón de la solución anestésica para los animales, se administró intramuscularmente a 4 ratones en cada grupo, y se sacrificó a estos mediante sangrado de la aorta abdominal bajo la anestesia. A continuación, los ratones se diseccionaron, extrayendo estérilmente los pulmones.

4.5. Registro de la tasa de supervivencia de los ratones después de inocular el virus de la gripe

Hasta 11 días después de la inoculación del virus de la gripe, la tasa de supervivencia de los ratones se confirmó y registró una vez al día.

4.6. Preparación del homogenado pulmonar y solución de dilución

Se obtuvo un homogenado pulmonar añadiendo 3 ml de BSA al 0,1%, 10 mM HEPES, Medio Esencial Mínimo (MEM, GIBCO) que contenía antibióticos y homogenizando utilizando un homogenizador politónico. El homogenado pulmonar se dispersó en criotubos y se guardó en un congelador de temperatura ultrabaja.

Se llevó a cabo una serie de diluciones de 10 o de $10^{0,5}$ veces, utilizando el medio MEM, al cual se había añadido antibióticos mencionados anteriormente y tripsina (SIGMA, T-4549, 2 mg/mL).

4.7. Preparación del medio para el crecimiento celular

El medio para el crecimiento celular (MEM + FBS al 10%) se preparó añadiendo 50 ml de suero bovino fetal: FBS a 500 ml de MEM, y se guardó en una nevera hasta utilizarlo.

4.8. Cultivo de MDCK (riñones caninos Madin-Darby), derivados de riñones caninos.

Las células congeladas y almacenadas MDCK ase descongelaron rápidamente en agua caliente, suspendiéndose entonces en 10 ml del medio para crecimiento celular, eliminándose el sobrenadante mediante centrifugación (1000 rpm, 5 minutos, 4º C). Un sedimento celular recuperado mediante centrifugación se suspendió en el medio para el crecimiento celular. Las células se sembraron en un matraz de cultivo, y se cultivaron en un incubador con CO_2 a 37ºC. Después de que el cultivo empezara, se observó bajo un microscopio, la morfología y el crecimiento de las células, justo antes de que las células MDCK presentaran confluencia, lavándose las células con D-PBS(-), tratando entonces a las células con tripsina para que se dispersaran, suspendiéndolas entonces en el medio para el crecimiento celular. La suspensión celular se sembró en el recipiente de cultivo, añadiéndose el medio recién preparado para el crecimiento celular para realizar el pase celular.

4.9. Preparación del medio para el crecimiento vírico (medio de mantenimiento)

El medio en el que el BSA al 0,1% se había añadido a 500 ml de MEM (se añadieron 10 mM de tampón HEPES), se convirtió en el medio para el crecimiento vírico (MEM + BSA al 0,1%), guardándose en la nevera después de la preparación, hasta que se utilizara. Se añadieron antibióticos habitualmente empleados.

4.10. Medición del título de infectividad vírica (Efecto Citopático, método CPE)

Justamente antes de que las células MDCK en los matraces de cultivo se volvieran confluentes, se proporcionó a las células el tratamiento con tripsina para dispersarlas, contándose el número de éstas, preparándose una suspensión de éstas a 6 x 10^5 células/ml, utilizando el medio de mantenimiento. Éste se dispensó en una cantidad de 0,05 ml a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, cultivándose durante la noche en un incubador de CO_2, con CO_2 al 5% a 37ºC.

Al día siguiente, se confirmó que las células se adherían y cada dilución del homogenado pulmonar realizada previamente se dispensó en una cantidad de 0,05 ml en cada pocillo, para 6 pocillos en la placa de 96 pocillos, que se cultivó entonces en el incubador de CO_2 con CO_2 al 5%, a 37ºC, durante 3 días.

Al tercer día del cultivo, se confirmó que las células en el pocillo estaban desnaturalizadas, y entonces, a cada pocillo en la placa de 96 pocillos, para finar y teñir las células se dispensó a cada pocillo una solución de cristal violeta que contenía formaline al 30%, calculándose entonces, mediante el procedimiento Reed-Münch, el título de infectividad vírica en los pulmones.

4.11 Efectos de cada grupo vacunal en el título de infectividad de los virus *in vivo* en los ratones

Los títulos de infectividad en los homogenados pulmonares murinos en el grupo de control (incubados con AcNPV), y los grupos de ensayo (incubados con el baculovirus recombinante [incluyendo el vector de transferencia: AcNPV-Dual-H1N1/HA1, obtenido en el Ejemplo 1(3)], y el baculovirus recombinante (que contiene el vector: AcNPV-CMV-H1N1/HA completo obtenido en el Ejemplo de Referencia 1), se compararon. Cada título de infectividad vírica se convirtió a logaritmos. El efecto terapéutico entre los grupos se analizó por el ensayo Tukey (Release 8.1, SAS Institute Japan Ltd), considerando la multiplicidad.

Los resultados se muestran en la figura 1.

Efecto de cada vacuna sobre el período de supervivencia después de la infección con el virus de la gripe.

Los períodos de supervivencia en el grupo de control (inoculados con AcNPV) y los grupos vacunales (incubados con AcNPV-Dual-H1N1/HA1 o AcNPV-CMV-H1N1/HA, se compararon utilizando un ensayo del orden logarítmico, mostrándose los resultados en la figura 2.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el sistema SAS (SAS Institute Japan, R.8.1). Un nivel significativo fue el 5%.

4.12. Título de infectividad vírica en pulmones

El grupo en el que AcNPV-Dual-H1N1/HA1 se había inoculado intramuscularmente, el título de infectividad vírica en los pulmones en el día 6 después de la infección, fue inhibido significativamente (p=0,0009), comparado con el grupo de control (inoculado con AcNPV). Mientras, en el grupo en el que AcNPV-Dual-H1N1/HA1 se había inoculado intramuscularmente, el título de infectividad del virus en los pulmones en el día 6 después de la infección, fue significativamente inhibido (p=0,0094), comparado con el grupo en el que AcNPV-CMV-H1N1/HA completo se había inoculado.

4.13. Período de supervivencia

En el grupo en el cual AcNPV-Dual-H1N1/HA1 se había incubado intramuscularmente, el período de supervivencia se prolongó significativamente (p=0,0031), comparado con el grupo de control (incubado con AcNPV). Mientras el periodo de supervivencia en el grupo en el que AcNPV-CMV-H1N1/HA completo se había inoculado, no fue significativamente (p=0,7851) del grupo de control, inoculado con AcNPV). El período de crecimiento en el grupo de control en el que se inoculó intramuscularmente AcNPV-Dual-H1N1/HA1, se prolongó significativamente (p=0,0031), comparado con el grupo en el que AcNPV-CMV-H1N1/HA completo se había inoculado.

En este sistema de evaluación, el virus de la gripe provoca en los ratones neumonía, y éstos mueren. Así, se especula que el crecimiento del virus en los pulmones fue inhibido para reducir la muerte de los ratones a causa de la neumonía, inoculando intramuscularmente AcNPV-Dual-H1N1/HA1.

[Ejemplo 5]. Ensayo de la expresión del antígeno vacunal a partir del baculovirus recombinante en células de insectos

Las células Sf-9 se cultivaron en una cantidad de 3 x 10^6 por pocillo, en una placa de 12 pocillos, siendo éstos infectados por partículas baculovíricas de AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-HSP65 o AcNPV-Dual-H1N1/HA1 obtenidas en el Ejemplo 2, o por el baculovirus de tipo salvaje ACNP-WT, como control, que llevaron a cabo una multiplicidad infecciosa de un rango de alrededor de 5. Después de 3 a 4 días, se eliminó el sobrenadante del cultivo, enjuagándose la placa tres veces con PBS, y entonces, se añadió, para lisas completamente las células, 0,2 ml por pocillo de solución de Leamuli (tricloruro, pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,1%), que contenía 2-mercaptoetanol al 2%. La mezcla se hirvió a 95ºC durante 5 minutos, y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE. Después de ésta, la proteína se transfirió sobre una membrana PVDF (immobilon-P- proporcionada por Millipore), realizándose un bloqueo sumergiendo la membrana en angiotensina bloqueante (proporcionado por Dai Nippon Pharmaceutical Co., Ltd.), a 4ºC durante 12 horas. Se llevó a cabo una transferencia Western de la siguiente forma: La membrana a la cual las proteínas de las células SF-9 infectadas con cada baculovirus se habían

transferido, se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG murino (proporcionado por Sigma) como el anticuerpo primario, incubándose entonces con un anticuerpo IgG (H+L) anti-ratón de cabra marcado con biotina como segundo anticuerpo (proporcionado por Vector). Posteriormente, se añadió una fosfatasa alcalina marcada con avidina (proporcionada por GIBCO-BRL) desarrollándose un color con NBT/BCIP (proporcionada por GIBCO-BRL) para detectar bandas de la proteína.

Los resultados se muestran en la figura 3.

La figura 3 muestra un análisis de transferencia Western que muestra la expresión del antígeno de fusión del gen HA del virus de la gripe, el gen Hsp65 de *M. tuberculosis*, y el gen CSP del parásito de la malaria, del vector recombinante de transferencia en el baculovirus recombinante en las células de insectos. En la figura, el carril 1 muestra las bandas del baculovirus de tipo salvaje AcNPV-WT, el carril 2 muestra bandas del baculovirus recombinante (AcNPV-Dual-H1N1/HA1 en el que el gen HA del virus de la gripe se insertó bajo el promotor dual, el carril 3 muestra las bandas del baculovirus de tipo salvaje, (AcNPV-WT), el carril 4 muestra las bandas del baculovirus recombinante AcNPV-Dual-Hsp65, en el que el gen Hsp65 del *M. tuberculosis*, se insertó bajo el promotor dual, el carril 5 muestra las bandas del baculovirus de tipo salvaje, AcNPV-WT) y el carril 6 muestra las bandas del baculovirus recombinante (AcNPV-Dual-PbCSP) en el que el gen CSP del parásito de la malaria se insertó bajo el promotor dual.

Tal como se muestra en los carriles 2, 4 y 6 en la figura, la banda que corresponde al producto de fusión expresado del gen del antígeno extraño inmunogénico y del gen gp64, se observa en el baculovirus recombinante, en el que cada gen antigénico y el gen gp64 se fusionaron y expresaron bajo el promotor dual.

A partir de esto, se identificó que el gen del antígeno extraño inmunogénico y el gen gp64 pueden fusionarse y expresarse en las células de insectos.

[Ejemplo 6]. Ensayo de expresión del antígeno vacunal del baculovirus recombinante en mamíferos

Las células HepG2 se infectaron con AcNPV-Dual-Hsp65, o AcNPV-WT como control, en un modo infeccioso múltiple de 1 aproximadamente. Después de 24 horas, se eliminó el sobrenadante del cultivo, se enjuagó la placa tres veces con PBS, y entonces, una solución etanólica de acetona (7:3), enfriada a –20ºC, se añadió para fijar las células a –20ºC durante 5 minutos. El bloqueo se llevó a cabo a temperatura ambiente añadiendo suero normal de cabra al 5% (proporcionad por Sigma). A continuación, se añadieron e incubaron un anticuerpo anti-Hsp65 murino (Yoshida et al., Vaccine 2005), como anticuerpo primario, y entonces el IgG (H+L) anti-murino de cabra, marcado con FITC. Las células que reaccionaron se detectaron bajo un microscopio de fluorescencia.

También se cultivaron células HepG2, a razón de 1 x 10^7 por placa de 100 mm, y se infectaron, con AcNPV-Dual-H1N1/HA1 o AcNPV-CMV-H1N1/HA completos, o con AcNPV-WT como control en modo infeccioso múltiple de alrededor de 5. Después de 2 horas, se eliminó el sobrenadante del cultivo, se enjuagó 3 veces la placa con PBS, y se cultivaron entonces las células en el medio que no contenía metionina y cisteína (medio en el cual FBS al 10% dializado contra PBS, se añadió al medio Eagle Modificado de Dulbecco (Invitrogen), durante 3 horas. Se añadió una solución de metionina y cisteína marcada isotópicamente (TRANS35S-LABEL MP Biomedicals, Inc.), a una concentración final de 5 µCi/mL. Después de 12 horas, se eliminó el sobrenadante del cultivo, se enjuagó 3 veces la placa cpn PBS, y entonces las células se lisaron con 0,5 ml de tampón RIPA (deoxicolato sódico al 1%, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), para obtener una muestra. Ésta se añadió al transportador Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia), al que, anteriormente, el suero de los ratones infectados con el virus de la gripe, se había absorbido, incubándose en hielo durante 2 horas. El transportador se lavó 5 veces con el tampón RIPA. Se añadió la solución de Leamuli que contenía 2-mercaptoetanol al 2%, hirviéndose entonces la muestra a 95ºC durante 5 minutos, y sometiéndola a electroforesis sobre SDS-PAGE al 6%. Después de la electroforesis, se secó el gel, y la proteína que había reaccionado con el anticuerpo, se detectó mediante autoradiografía.

Los resultados se muestran en las figura 4 y 5.

figura 4(A) muestra las células teñidas con el anticuerpo marcado fluorescénicamente que muestra la expresión del gen Hsp65 de *M. tuberculosis* en el baculovirus recombinante en las células HepG2.

La figura 4(B) muestra el caso en el que el baculovirus recombinante de tipo salvaje se añadió a las células HepG2.

Como es evidente a partir de (A) en la figura, se encontró que el baculovirus recombinante, utilizando el vector de transferencia con el promotor dual, puede expresar el antígeno objetivo en células de mamíferos.

Esto sugiere que, cuando se administra al mamífero, incluyendo al hombre, el baculovirus recombinante producido a partir del vector de transferencia recombinante, penetra en las células de mamíferos, el promotor de mamíferos actúa, y el gen antigénico extraño objetivo y el gen gp64, se fusionan en las células de mamífero, para inducir la inmunidad adquirida.

La figura 5 muestra un análisis de inmunoprecipitación de la expresión del antígeno de fusión en el baculovirus recombinante, en el cual el gen del antígeno HA del virus de la gripe se incorporó bajo un promotor dual a las células de mamífero. En la figura, el carril 1 muestra el baculovirus de tipo salvaje (AcNPV-WT), el carril 2 el baculovirus recombinante (AcNPV-CMV-H1N1/HA) en el que el gen del antígeno HA del virus de la gripe se incorporó bajo el promotor CMV, y el carril 3 muestra el baculovirus recombinante (AcNPV-Dual-H1N1/HA1) en el cual el gen del antígeno HA del virus de la gripe, se incorporó para fusionarse con el en gp64 y llevar a cabo la expresión bajo el promotor dual.

En el baculovirus recombinante (AcNPV-CMV-H1N1/HA) en el que el gen del antígeno del virus de la gripe se incorporó bajo el promotor CMV, y el baculovirus recombinante (AcNPV-Dual-H1N1/HA1) en el que el gen del antígeno HA del virus de la gripe se incorporó para fusionarse con el gen gp64 y expresarse bajo un promotor dual, es evidente que la proteína que reacciona específicamente con el suero infectado con el virus de la gripe, es decir, la proteína que incluye el antígeno HA, se sintetizó nuevamente en las células HepG2.

A partir de esto, se piensa que el baculovirus recombinante expresa la proteína antigénica codificada por el gen antigénico extraño inmunogénico deseado, incluso en las células de mamíferos, y que cuando el virus recombinante se administra a los mamíferos, incluyendo al hombre, con la expresión del antígeno de fusión en las células humanas, puede inducirse la inmunidad adquirida específica para el antígeno.

[Ejemplo 7]. Ensayo de identificación del antígeno de fusión en el antígeno vacunal que se presenta en la partícula vírica (virion) del baculovirus recombinante

A 0,005 ml de cada solución concentrada vírica de las partículas baculovíricas, AcNPV-WT, AcNPV-CMV-PbCSP, AcNPV-PbCSPsurf o AcNPV-Dual-PbCSP, recogidas mediante ultracentrifugación, se añadieron 0,005 ml de solución de Leamuli (2x), que se hirvieron entonces a 95ºC durante 5 minutos, y se sometieron a electroforesis sobre SDS-PAGE al 6%. Después de ésta, las proteínas se transfirieron a la membrana PVDF (Immobilon-P proporcionada por Millipore), llevándose a cabo el bloqueo sumergiendo la membrana en el enzima conversor de angiotensina bloqueante (proporcionado por Dai Nippon Pharmaceutical Co., Ltd.), a 4ºC durante 12 horas. Se realizó una transferencia Western mediante el procedimiento siguiente: La membrana a la que las proteínas de la partícula vírica se habían transferido, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG murino (proporcionado por Sigma) como anticuerpo primario, incubándose entonces con el anticuerpo IgG (H+L) antimurino de cabra marcado con biotina, como segundo anticuerpo (proporcionado por Vector). Posteriormente, la fosfatasa alcalina marcada con avidina (proporcionada por GIBCO-BRL), se añadió revelándose el color con NBT/BCIP (proporcionado por GIBCO-BRL) para detectar bandas de la proteína.

Los resultados se muestran en la figura 6.

Esta figura muestra el análisis de transferencia Western que muestra la expresión del gen CSP de la malaria en las partículas víricas del baculovirus recombinante formado a partir del vector recombinante de transferencia. En la figura, el carril 1 muestra el baculovirus de tipo salvaje. El carril 2 muestra el baculovirus recombinante obtenido a partir del vector de transferencia, en el que el gen antigénico PbCSP se insertó bajo el control del promotor mamífero, el carril 3 muestra el baculovirus recombinante obtenido a partir del vector de transferencia, en el que el gen antigénico PbCSP se insertó para fusionarse con el gen gp64 y expresarse bajo el control del promotor polihedrínico del baculovirus, y el carril 4 muestra el baculovirus recombinante obtenido a partir del vector de transferencia, en el que el gen antigénico PbCSP se insertó para fusionarse con el gen gp64 y expresarse bajo el control de un promotor dual. Los baculovirus se sometieron a electroforesis, y el producto de expresión del gen PbCSP fusionado y del gen gp64, se identificó.

Tal como se muestra en los carriles 3 y 4, para AcNPV-PbCSPsurf y AcNPV-Dual-PbCSP, la banda intensa que indicaba la presencia del antígeno de fusión, se identificó en las partículas víricas recombinantes.

De este modo, del Ejemplo 7 se deduce que en el baculovirus recombinante producido a partir del vector recombinante de transferencia, el producto de expresión del gen gp64 fusionado al gen extraño inmunogénico deseado, puede encontrarse en las partículas víricas recombinantes.

[Ejemplo 8]. Expresión génica mantenida por intercambio del promotor

1) Expresión génica mantenida por intercambio del promotor

Para identificar si el virus recombinante mantiene la expresión antigénica en las células cultivadas, se infectaron células HeLa con AcNPV-CP-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1 o AcNPV-CU-H1N1/HA1, identificándose el antígeno de expresión. Se sembraron las células en una placa de 24 pocillos, a razón de 1,0 x 10^4 células/pocillo, infectándose entonces con el virus a una MOI = 10, 20 ó 100, que se adhirió durante una hora. A continuación, se eliminó el virus del sobrenadante de un cultivo celular, cultivándose las células en un incubador. Con el tiempo, las células se recuperaron, y se extrajo el A. Se llevó a cabo la RT-PCR con el ARN extraído, utilizando como matriz el cebador HA1_F01 (5'-GAGCTGAGGGAGCAATTGAG-3' (secuencia SEC ID nº 51) y el cebador HA1_R01 (5'-

GGGTGATGAATACCCCACAG-3 (secuencia SEC ID nº: 52). El ADN amplificado se analizó mediante electroforesis.

Como resultado, se identificó la expresión en los tres tipos, lo que confirmó que el promotor CMV puede convertirse en otro promotor eucariota con respecto al baculovirus recombinante.

La figura 7 muestra los resultados de la detección de la expresión génica en las células HeLa mediante RT-PCR. M representa marcadores de ADN para electroforesis. Las muestras son de la siguiente forma:

1. ARN de células infectadas con virus de tipo salvaje con MOI=10;
2. ARN de células infectadas con virus de tipo salvaje con MOI=20;
3. ARN de células infectadas con virus de tipo salvaje con MOI=100;
4. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CP-H1N1/HA1 con MOI=10;
5. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CP-H1N1/HA1 con MOI=20;
6. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CP-H1N1/HA1 con MOI=100;
7. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CU-H1N1/HA1 con MOI=10;
8. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CU-H1N1/HA1 con MOI=20;
9. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CU-H1N1/HA1 con MOI=100;
10. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CAP-H1N1/HA1 con MOI=10;
11. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CAP-H1N1/HA1 con MOI=20; y
12. ARN de células infectadas con virus AcNPV-CAP-H1N1/HA1 con MOI=100.

La muestra se recogió en los tiempos de 0 horas, un día, 4 días y 7 días después de la infección, se amplificó mediante RT-PCR, y el ADN amplificado se sometió a electroforesis.

[Ejemplo 9]. Título de anticuerpos y inmunidad celular inducida por el virus recombinante antigénico PbCSP

1. Inoculación de la vacuna

Se incubó una solución del virus recombinante para la vacunación, a ratones hembra BALB/c tres veces a intervalos de tres semanas. Se preparó una dosis para inoculación con 0,2 ml/animal, correspondiente a una cantidad de virus de 1 x 10^8 pfu/animal, para inyectarla intramuscularmente en el muslo. Como vacuna se inyectaron el virus de tipo salvaje (AcNPV-WT, AcNPV-PbCSPsurf (Yoshida et al., Virology 316: 161-70, 2003) o AcNPV-Dual-PbCSP.

2. Anatomía murina

Se sacrificó a los ratones tres semanas después de la última inmunización, extrayéndose el suero y el bazo de los animales. El suero se utilizó para medir el título específico de anticuerpos y el bazo para llevar a cabo el ensayo ELISPOT.

3. Medición del título de anticuerpos

El título de anticuerpos se midió mediante ELISA, utilizando una placa en la que se había inmovilizado una proteína recombinante PbCSP expresada contundentemente en *Escherichia coli* y que se purificó y recuperó. ELISA se llevó a cabo según los procedimientos estándar. Como resultado, aunque no se identificó ningún aumento del título de anticuerpos en grupos en los que no se habían inoculado virus o el virus de tipo salvaje se había inoculado, el aumento del título de anticuerpos específicos, pudo identificarse en el grupo en el que AcNPV-PbCSPsurf se había inoculado y en el que había pasado lo mismo con AcNPV-Dual-PbCSP.

En la figura 8, se muestran los títulos de anticuerpos IgG, específicos para PbCSP en el grupo no inoculado, en el grupo inoculado del virus de tipo salvaje, en el grupo inoculado con AcNPV-PbCSPsurf, y en el grupo inoculado con AcNPV-Dual-PbCSP.

4. Evaluación de la inmunidad celular utilizando el ensayo ELISPOT

El ensayo ELISPOT se realizó utilizando células del bazo de ratones inmunizados. Estas células del bazo de los ratones se prepararon, añadiéndose un número apropiado de las células a MultiScreen-IP (Millipore). Se añadió entonces un péptido (secuencia aminoácida: SYIPSAEKI SEC ID nº: 53), conocida como un epítopo CD8 de PbCSP. el cual se cultivó entonces por la noche. A continuación, se llevó a cabo la reacción utilizando el Equipo ELISPOT Mouse IFN-γ ELISPOT (BD Sciences), y se desarrolló un color utilizando el conjunto AEC de sustrato (BD Sciences). El número de células que había respondido específicamente al antígeno se identificó midiendo manchas coloreadas. Como resultado, no se pudo identificar células específicas para el antígeno en el grupo en el que no se habían inoculado virus, o se habían inoculado el de tipo salvaje o AcNPV-PbCSPsurf, pero se identificaron 350 células que habían reaccionado por 10^6 células del bazo, en el grupo en el que se había inoculado AcNPV-Dual-PbCSP. Esto ha demostrado que AcNPV-Dual-PbCSP puede inducir más significativamente la inmunidad celular que AcNPV-PbCSPsurf.

En la figura 9 se muestran los números de células que producen IFN-γ específicas para el epitopo CTL de PbCSP en el grupo no inoculado, en el grupo inoculado con el virus de tipo salvaje, en el grupo inoculado AcNPV-PbCSPsurf y en el grupo inoculado AcNPV-Dual-PbCSP.

[Ejemplo 10]. Ensayo para confirmar los efectos antivíricos de la vacuna que incluye un baculovirus recombinante como principio activo

(Ensayo para confirmar los efectos del baculovirus recombinante M2e).

El baculovirus recombinante M2e AcNPV-Dual-M2e, en una cantidad de 3,4 x 10^8 PFU por ratón, se inoculó en los músculos de los muslos, 2 veces a intervalos de 2 semanas. Los ratones se infectaron con el virus A/PR8/34 de la gripe, inoculando 0,005 ml de solución conteniendo 1000 $TCID_{50}$ del virus intranasalmente dos semanas después del final de la inoculación de la vacuna. A los 6 días después de la infección, los ratones se sacrificaron, se extrajeron los pulmones y la cantidad de virus en los pulmones se detectó utilizando células MDCK. Como resultado, no pudieron detectarse virus de la gripe en todos los ratones que se inocularon con AcNPV-Dual-M2e. Al mismo tiempo, este era el mismo efecto que en el grupo en el cual la vacuna del baculovirus recombinante HA1 (AcNPV-Dual-H1N1/HA1 (1,0 x 10^7 PFU por ratón) se había inoculado en el músculo del muslo.

En la figura 10 se muestran las cantidades intrapulmonares de virus 6 días después de la infección con el virus de la gripe, en el grupo PBS, en el grupo inoculado AcNPV-Dual-M2e y en el grupo inoculado AcNPV-Dual-H1N1/HA1.

[Ejemplo 11]. Estudio para identificar el efecto preventivo del medicamento que contiene el baculovirus recombinante HA1/NC99 como principio activo

El baculovirus recombinante HA1/NC99 (AcNPV-Dual-HA1/NC99) a 1,0 x 10^8 PFU por ratón, se inoculó en los músculos de los muslos dos veces, con un intervalo de 2 semanas. Dos semanas después de la inoculación final, los ratones se infectaron con el virus A/NewCaledonia/20/99 de la gripe, mediante 0,05 ml de una solución que contenía el virus a 1000$TCID_{50}$, en una cantidad nasal. Tres días después de la infección, se sacrificaron los animales, se extrajeron los pulmones, y la cantidad intrapulmonar de virus se detectó utilizando células MDCK. Como resultado, no se pudo detectar virus de la gripe en tres de los cuatro ratones a los que se había inoculado AcNPV-Dual-H1N1/NC99.

En la figura 11 se muestran las cantidades intrapulmonares de virus tres días después de la infección, con el virus de la gripe en el grupo PBS, en el grupo inoculado con el virus de tipo salvaje (AcNPV-WT) y con el virus inoculado AcNPV-Dual/HA1/NC99

SEC ID nº: 25 y 26 representan los cebadores para identificar la expresión de AcNPV-CP-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1 y AcNPV-CU-H1N1/HA1.

SEC ID nº: 27 representa un péptido conocido como un epitopo CD8 de PbCSP.

[Ejemplo 12]. Estudio para identificar anticuerpos específicos dependiendo de las vías de administración de la composición farmacéutica que contiene el baculovirus recombinante como principio activo

Se inoculó el baculovirus recombinante HA1 (AcNPV-Dual-H1N1/HA1 a 2,0 x 10^7 PFU por ratón, 2 veces con in intervalo de 2 semanas, mediante 0,005 ml de la solución vírica en ambas narices (gotas nasales), inoculando 0,05 ml de la solución vírica a través de la nariz (rinovacunación), inoculando 0,05 ml de la solución vírica a través del tracto respiratorio e inoculando 0,05 ml de la solución vírica en el músculo (inyección intramuscular). Dos días después de la inoculación final, se recogieron un lavado nasal, un alveolar y también suero, identificándose la expresión del anticuerpo específico para el virus de la gripe. El título de anticuerpos se midió mediante ELISA, utilizando una placa, en la que se había inmovilizado un extracto de células MDCK infectadas con el virus A/PR/8/341 de la gripe. ELISA se llevó a cabo según procedimientos estándar. Como resultado, se identificó en la sangre el anticuerpo IgG específico a partir del grupo de rinovacunación, del grupo de vacunación intratraqueal y del grupo de vacunación intramuscular. En particular, se identificó que el anticuerpo era inducido fuertemente en el grupo de vacunación intratraqueal. Además, en el grupo de vacunación intratraqueal, en el lavado alveolar, se identificó también la producción del anticuerpo antigénico especifico IgA.

En la figura 12 se muestran los resultados del ELISA en la medición del anticuerpo IgG específico para el virus de la gripe en la sangre, en el grupo de instilación de gotas nasales, en el grupo de rinovacunación, en el grupo de vacunación intratraqueal y en el grupo de vacunación intramuscular.

En la figura 13, se muestran los resultados del ELISA en la medición de los anticuerpos específicos para el virus de la gripe, en el lavado nasal y alveolar, en IgG e IgA en el grupo de instilación de gotas nasales, en el grupo de rinovacunación, en el grupo de vacunación intratraqueal y en el grupo de vacunación intramuscular.

[Ejemplo 13]. Estudio para identificar efectos dependiendo de las vías de administración de la composición farmacéutica que contiene el baculovirus recombinante como principio activo

El baculovirus recombinante HA1 (AcNPV-Dual-H1N1/HA1) a 1,0 x 10^7 PFU por ratón, se inoculó dos veces con un intervalo de dos semanas, mediante la vía de administración de gotas nasales, rinovacunación, a través del tracto respiratorio, o mediante inyección muscular. Dos semanas después de la inoculación final los ratones se infectaron con el virus A/PR/8/34 de la gripe, inoculando 0,005 ml de una solución que contenía el virus a 1000$TCID_{50}$ en la cavidad nasal. Tres días después de la infección, se recogió el lavado nasal, 6 días después de la infección se extrajo el pulmón, y, utilizando las células MDCK, se detectó la cantidad de virus intrapulmonar. Como resultado, la cantidad de virus en la cavidad nasal, 3 días después de la infección, se redujo apreciablemente en el grupo de rinovacunación y en el de vacunación intratraqueal. Además, en el grupo de vacunación intratraqueal, la cantidad intrapulmonar del virus 6 días después de la infección, se redujo a un límite de detección o inferior, así como en el grupo de vacunación intramuscular.

En la figura 14, se muestran las cantidades de virus en el lavado nasal 3 días después de la infección con el virus de la gripe en el grupo que recibió gotas nasales, el grupo de rinovacunación, el grupo de vacunación intratraqueal y el grupo de vacunación intramuscular.

En la figura 15, se muestran las cantidades de virus intrapulmonares, 6 días después de la infección con el virus de la gripe en el grupo de goteo nasal, en el grupo de rinovacunación, en el grupo de vacunación intratraqueal y el grupo de vacunación intramuscular.

Texto libre de listado de secuencias

SEC ID nº: 1 y 2 son las secuencias de los cebadores PbCSP-F y PbCSP-R1 para PCR del ADN genómico de la cepa *P. Berghei* ANKA;

SEC ID nº: 3 Y 4 son las secuencias de los cebadores phsp65-F1 y phsp65-R1 para PCR del ADN genómico de H37Rv del *M. tuberculosis*;

SEC ID nº: 5 Y 6 son las secuencias de los cebadores phsp65-F2 y phsp65-R2 para PCR con PcADN como matriz;

SEC ID nº: 7 y 8 son las secuencias de los cebadores pPolh-F2 y pgp64-R2 para PCR con pBACgus-1 (proporcionado por Novagen) como matriz, para obtener un fragmento de ADN del gen gp64;

SEC ID nº: 9 y 10 son las secuencias de los cebadores HA-f y HA-r para PCR para obtener un fragmento génico HA del virus de la gripe; y

SEC ID nº: 11 y 12 son las secuencias de los cebadores pHA-F1 y pHA-R1 para PCR con pCR-Blunt-HA como la matriz.

SEC ID nº: 13 y 14 son las secuencias de los cebadores pTRAMP-F1 y pTRAMP-R1 para PCR del gen PbTRAMP.

SEC ID nº: 15 y 16 son las secuencias de los cebadores pAMA-F1 y pAMA-R1 para PCR del dominio 123 del gen PbAMA1 (D123).

SEC ID nº: 17 y 18 son las secuencias de los cebadores pMsp-F1 y pMsp-R1 para PCR del gen PbMSP119.

SEC ID nº: 19 y 20 son las secuencias de los cebadores pPfCSP-F1 y pPfCSP-R1 para PCR del gen PfCSP.

SEC ID nº: 21 y 22 son las secuencias de los cebadores pPfAMA1-F1 y pPfAMA1-R1 para PCR del gen PfCSP de la cepa 3D7 del parásito *P. falciparum* de la malaria.

SEC ID nº: 23 y 24 son las secuencias de los cebadores pPfs25-F1 y pPfs25-R1 para PCR del gen PfCSP de la cepa 3D7 del parásito de la malaria *P. falciparum*.

SEC ID nº: 25 Y 26 son las secuencias de los cebadores Polh-f RsrII y GP64-r DraIII para PCR con pCR-Blunt-HA como matriz.

SEC ID nº: 27 y 28 son las secuencias de los cebadores CMVenh-f FseI y CMVenh-r KpnI para PCR de la región promotora CMV.

SEC ID nº: 29 y 30 son las secuencias de los cebadores UBBp-f KpnI y UBBp-r RsrII para PCR de la región promotora UBB.

SEC ID nº: 31 y 32 son las secuencias de los cebadores NP-f EcoRI y NP-r Cfr9I para RT-PCR del ARN genómico

de la cepa PR8/34 del virus de la gripe.

SEC ID nº: 33 y 34 son las secuencias de los cebadores M2-fEcoRI y M2-r Cfr9I para la RT-PCR del ARN genómico de la cepa PR8/34;

SEC ID nº: 35 y 36 son las secuencias de los cebadores NAe-f EcoRI y NAe-r Cfr9I para la RT-PCR del ARN genómico del virus de la cepa PR8/34 del virus de la gripe;

SEC ID nº: 37 y 38 son las secuencias de los cebadores M2-f EcoRI y M2e-r Cfr9I para la PCR cn pDual-H1N1/M2-gp64 como matriz.

SEC ID nº: 39 y 40 son las secuencias de los cebadores HA1-f EcoRI y HA1-r CRf9I (NC99) para la RT-PCR del ARN genómico de NewCaledonia99/20 (NC99);

SEC ID nº: 41 y 42 son las secuencias de los cebadores HA0-f EcoRI y HA2-r Cfr9I para la PCR con pCR-Blunt-HA como matriz;

SEC ID nº: 43 y 44 son las secuencias de los cebadores HA2-f EcoRI y HA2-r Cfr9I para la PCR con pCR-Blunt-HA como matriz;

SEC ID nº: 45 y 46 son las secuencias de los cebadores vp39-f y vp39-r para la PCR de la región del gen vp39.

SEC ID nº: 47 y 48 son las secuencias de los cebadores Polh-S1 y HA1-r EcoRI para PCR del fragmento génico HA1.

SEC ID nº: 49 y 50 son las secuencias de los cebadores NP-f5 EcoRI y NP-r EcoRI para la PCR con pDual-H1N1/NP-gp64 como matriz.

SEC ID nº: 51 y 52 son las secuencias de los cebadores para detectar la expresión de AcNPV-CP-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1 y AcNPV-CU-H1N1/HA1.

SEC ID nº: 53 es un polipéptido que es conocido como el epítopo CD8 de PbCSP.

También se da a conocer:

1. Procedimiento para producir un vector de transferencia que incluye una estructura en la que se han incorporado un promotor dual y un gen de fusión, caracterizada por que el gen de fusión comprende, por lo menos, un gen que codifica una proteína que puede constituir un componente de una partícula vírica y, por lo menos, un gen extraño inmunogénico, se unen por debajo del promotor dual que enlaza un promotor vertebrado y otro promotor del baculovirus.

2. El procedimiento según el apartado 1, en el que el promotor vertebrado es un promotor de mamíferos.

3. El procedimiento según el apartado 1, caracterizado por que el gen que codifica por lo menos una proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, es cualquiera de un gen gp64 del baculovirus, de una glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo I, de la glicoproteína de la membrana del virus sincitial respiratorio humano, de una proteína hemoaglutinínica del virus tipo A de la gripe, de una proteína inmunoaglutinínica del virus del tipo B de la gripe, de una glicoproteína del virus del herpes simple, de la proteína S del virus de la hepatitis murina.

4. El procedimiento según el apartado 1, en el que el promotor vertebrado se selecciona a partir de cualquiera de un promotor citomegalovírico, un promotor SV40, un promotor retrovírico, un promotor metalotioneína, un promotor de proteína de choque térmico, un promotor CAG, un promotor del factor de elongación, un promotor actínico, un promotor ubiquitínico, un promotor de la albúmina, un promotor MHC de tipo II.

5. El procedimiento según el apartado 1, en el que el promotor baculovírico se selecciona a partir de un promotor polihedrínico, un promotor p10, un promotor IE1, un promotor IE2, un promotor p35, un promotor p39, y un promotor gp64.

6. El procedimiento según el apartado 1, en el que el gen extraño inmunogénico se selecciona a partir de cualquier antígeno de la malaria, de la gripe, del *M. Tuberculosis*, de un antígeno del virus SARS, del virus de la fiebre del oeste del Nilo, del virus de la fiebre del dengue, de HIV, de HCV, de la leishmaniosis, de un tripanosoma, de un parásito de peces, o un antígeno de fusión de, por lo menos, uno seleccionado de este grupo de antígenos génicos con una citoquina.

7. El procedimiento según el apartado 1, en el que el vector de transferencia es cualquiera de: pDual-Hsp65-

gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP129-gp64, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64, pDual-Pfs25-gp64, pDual-H5N1/HA1-gp64, pDual-SARS/S-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-M2e-gp64, pCP-HA1/NC99-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1-vp39 y pCP-H1N1/NP-vp39.

8. Procedimiento para obtener un baculovirus recombinante que incluye las etapas de producir un vector de transferencia que comprende una estructura a la que un promotor dual y un gen de fusión se ha incorporado, caracterizado por que el gen de fusión que comprende por lo menos un gen que codifica un gen que codifica una proteína capaz de constituir el componente de una partícula vírica y por lo menos un gen extraño inmunogénico, se unen por debajo del promotor dual, juntando un promotor vertebrado y otro promotor del baculovirus, co-transfectando el vector de transferencia y un ADN baculovírico en una célula huésped de un insecto, y separando el baculovirus recombinante.

9. El procedimiento según el apartado 8, caracterizado por que el gen que codifica por lo menos una proteína que puede ser capaz de constituir el componente de la partícula vírica en cualquiera de un gen gp64 del baculovirus, de una glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo I, de la glicoproteína de la membrana del virus sincitial respiratorio humano, de una proteína hemoaglutinínica del virus tipo A de la gripe, de una proteína inmunoaglutinínima del virus del tipo B de la gripe, de una glucoproteína del virus del herpes simple, de la proteína S del virus de la hepatitis murina.

10. El procedimiento según el apartado 9, en el que el promotor vertebrado se selecciona a partir de cualquiera de un promotor citomegalovírico, un promotor SV40, un promotor retrovírico, un promotor metalotioneínico, un promotor de una proteína de choque térmico, un promotor CAG, un promotor 1α del factor de elongación, un promotor actínico, un promotor ubiquitínico, un promotor de albúmina y un promotor MHC de tipo II.

11. El procedimiento según el apartado 8, en el que el promotor baculovírico es seleccionado a partir de un promotor polihedrínico, un promotor p10, un promotor IE1, un promotor p35, un promotor p39, y un promotor gp64.

12. El procedimiento según el apartado 8, en el que el gen extraño inmunogénico es seleccionado a partir de cualquier antígeno malárico, de la gripe, de *M. tuberculosis*, del virus SARS, del virus de la fiebre del Nilo oeste, del virus de la fiebre del dengue, del HIV, del HCV, de la leishmaniosis, del tripanosoma, de un parásito del pescado, o de un antígeno de fusión de uno seleccionado a partir de este grupo génico antigénico con una citoquina.

13. El procedimiento según el apartado 8, en el que el baculovirus recombinante es cualquiera de AcNPV-Dual-Hsp65, AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PbTRAMP, AcNPV-Dual-PbAMA1D123, AcNPV-Dual-PbMSP129, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-Dual-H5N1/HA1, AcNPV-Dual-SARS/S, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39, y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

14. Vector de transferencia que incluye una estructura en la que se ha incorporado un gen de fusión que comprende por lo menos un gen que codifica una proteína que puede constituir un componente de una partícula vírica, y por lo menos, un gen extraño inmunogénico, que se unieron por debajo de un promotor dual que una un promotor vertebrado y otro promotor baculovírico.

15. El vector de transferencia según el apartado 14, que incluye una estructura en la que se ha incorporado el gen de fusión que comprende por lo menos una proteína capaz de constituir el componente de la partícula vírica y por lo menos un gen extraño inmunogénico que se unieron por debajo del promotor dual que une un promotor vertebrado y otro del baculovirus.

16. El vector de transferencia según el apartado 14, caracterizado por que el gen que codifica por lo menos una proteína que puede constituir el componente de la partícula vírica, es cualquiera del gen gp64 del baculovirus del de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, de la glicoproteína del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I, de la glicoproteína de la membrana del virus sincitial respiratorio humano, de la proteína hemaglutinímica del virus A de la gripe, de la proteína hemaglutinímica del virus B de la gripe, de la glicoproteína del virus del herpes simple, y de la proteína S del virus de la hepatitis murina.

17. El vector de transferencia según el apartado 15, en el que el promotor vertebrado se selecciona a partir de un promotor baculovirus, un promotor SV40, un promotor retrovírico, un promotor metallotioneínico, un promotor de la proteína del choque térmico, un promotor CAG, un promotor 1α del factor de elongación, un promotor actínico, un promotor ubiquitínico, un promotor de la albúmina y un promotor MHCII.

18. El vector de transferencia según el apartado 15, en el que el promotor baculovírico se selecciona a partir de un promotor hedrínico, un promotor p10, un promotor IE1, un promotor IE2, un promotor p35, un promotor p39, un promotor gp64.

19. El vector de transferencia según el apartado 15, en el que el gen extraño inmunogénico se selecciona a partir de cualquiera de un antígeno malárico, de la gripe, de *M. tuberculosis*, del Virus SARS, del virus de la fiebre del Nilo Oeste, del virus de la fiebre del dengue, del HIV, del HCV, de la leishmaniosis, del tripanosoma, del de parásitos del pescado, o un antígeno de fusión de uno seleccionado a partir de este grupo de genes antigénicos, con una citoquina.

20. El vector de transferencia según el apartado 15, que es cualquiera de pDual-HsP-65-gp64, pDual-PbCSP-gp64, pDual-H1N1/HA1-gp64, pDual-PbTRAMP-gp64, pDual-PbAMA1D123-gp64, pDual-PbMSP129, pDual-PfCSP-gp64, pDual-PfAMA1-gp64, pDual-Pfs25-gp64, pDual-H5N1/HA1-gp64, pDual-SARS/S-gp64, pCP-H1N1/HA1-gp64, pCAP-H1N1/HA1-gp64, pCU-H1N1/HA1-gp64, pDual-H1N1/NP-gp64, pDual-H1N1/M2-gp64, pDual-H1N1/NAe-gp64, pDual-M2e-gp64, pCP-HA1/N99-gp64, pCP-H1N1/HA0-gp64, pCP-H1N1/HA2-gp64, pCP-H1N1/HA1-vp39 y pCP-H1N1/NP-vp39.

21. Baculovirus recombinante obtenido mediante el procedimiento de producirlo según cualquiera de los apartados 8 a 13.

22. El baculovirus recombinante según el apartado 21, que es cualquiera de AcNPV-Dual-Hsp65, AcNPV-Dual-PbCSP, AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PbTRAMP, AcNPV-Dual-PbAMA1D123, AcNPV-Dual-PbMSP129, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-Dual-H5N1/HA1, AcNPV-Dual-SARS/S, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

23. Composición farmacéutica que incluye el baculovirus recombinante según el apartado 1 ó 22.

24. La composición farmacéutica según el apartado 23, que comprende cualquiera de AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/C99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39.

25. Composición farmacéutica que incluye el baculovirus recombinante según el apartado 21 ó 22, en la que la composición se administra intramuscularmente, intranasalmente o mediante inhalación.

26. Vacuna que incluye cualquiera de AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39 como principio activo.

27. La vacuna según el apartado 26, en la que la vacuna se administra intramuscularmente, intranasalmente o mediante inhalación.

28. Agente preventivo o terapéutico para la infección por el virus de la gripe, que incluye AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/CN99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39 como principio activo.

29. El agente preventivo o terapéutico para la infección por el virus de la gripe según el apartado 28, en el que el agente se administra intramucularmente, intranasalmente o mediante inhalación.

30. Vacuna para la infección por el virus de la gripe, que incluye cualquiera de AcNPV-Dual-H1N1/HA1, AcNPV-H1N1/HA1, AcNPV-CAP-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-PfCSP, AcNPV-Dual-PfAMA1, AcNPV-Dual-Pfs25, AcNPV-CU-H1N1/HA1, AcNPV-Dual-H1N1/NP, AcNPV-Dual-H1N1/M2, AcNPV-Dual-H1N1/NAe, AcNPV-Dual-M2e, AcNPV-CP-HA1/NC99, AcNPV-CP-H1N1/HA0, AcNPV-CP-H1N1/HA2, AcNPV-CP-H1N1/HA1-vp39 y AcNPV-CP-H1N1/NP-vp39 como un principio activo.

31. La vacuna para la infección por el virus de la gripe según el apartado 30, en la que el agente se administra intramuscularmente, intranasalmente o mediante inhalación.

Listado de secuencias

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.,LTD Educational Foundation Jichi Medical university

<120> NUEVO VECTOR VÍRICO

<130> P07-20

<140> PCT/JP2007/052195
<141> 2007-02-08

<150> JP 2006-032863
<151> 2006-02-09

<160> 53

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 140
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 1
ggagggctag catggagaca gacacactcc tgctatgggt actgctgctc tgggttccag 60

gttccactgg tgacgcggat ccactgcagg actacaagga cgtagacaag ggatatggac 120

aaaataaagc atccaagccc 140

<210> 2
<211> 67
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 2
ggagggcggc cgcatcccgg gttttcttat ttgaaccttt tcgttttcta actcttatac 60

cagaacc 67

<210> 3
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 3
aataatagat ctaatggcca agacaattgc gtacgacgaa ga 42

<210> 4
<211> 63
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4

aatccaatgc ggccgcggga attcgattcc tgcaggtcag aaatccatgc cacccatgtc 60

gcc 63

<210> 5
<211> 74
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
caccctgca ggactacaag gacgacgatg acaaggaatt catggccaag acaattgcgt 60

acgacgaaga ggcc 74

<210> 6
<211> 37
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
cccgggcgaa atccatgcca cccatgtcgc cgccacc 37

<210> 7
<211> 48
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
cacccggacc ggataattaa aatgataacc atctcgcaaa taaataag 48

<210> 8
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 8
ggtaccatat tgtctattac ggtttctaat catac 35

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
cctgcaggta tgaaggcaaa cctactggtc 30

<210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 10
gcccgggcga tgcatattct gca 23

<210> 11
<211> 37
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
caccgaattc gacacaatat gtataggcta ccatgcg 37

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 12
cccgggcacc tctggattgg atggacggaa tg 32

<210> 13
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 13
caccgaattc aaaattgata cgaaaaaaaa tgaag 35

<210> 14
<211> 34
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 14
cccgggcttt taattttgag gagtctttat tttc 34

<210> 15
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 15
caccgaattc aatccatggg aaaagtatac ggaaaaatat 40

<210> 16
<211> 37
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 16
cccgggcttc tctggtttga tgggctttca tatgcac 37

<210> 17
<211> 75
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 17
caccctgcag gactacaagg acgacgatga caagcacata gcctcaatag ctttaaataa 60

cttaaataaa tctgg 75

<210> 18
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 18
cccgggttcc cataaagctg gaagagctac agaatacacc 40

<210> 19
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 19
caccgaattc ttattccagg aataccagtg ctatggaagt 40

<210> 20
<211> 34
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 20
cccgggcttt ttccatttta caaatttttt tttc 34

<210> 21
<211> 73
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 21
caccctgcag gactacaagg acgacgatga caagcagaat tattgggaac atccatatca 60

aaatagtgat gtg 73

<210> 22
<211> 34
<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 22
cccgggcttt cattttatca taagttggtt tatg 34

<210> 23
<211> 43
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 23
caccgaattc aaagttaccg tggatactgt atgcaaaaga gga 43

<210> 24
<211> 34
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 24
cccgggcagt acatatagag ctttcattat ctat 34

<210> 25
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 25
gggcggaccg gataattaaa atgataacca tctcg 35

<210> 26
<211> 37
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 26
gggcacttag tgatattgtc tattacggtt tctaatc 37

<210> 27
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 27
gggggccggc cctagttatt aatagtaatc aattac 36

<210> 28
<211> 34
<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 28
gggggtaccc atggtaatag cgatgactaa tacg 34

<210> 29
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 29
gggggtacct cgaggaaggt ttcttcaact c 31

<210> 30
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 30
gggcggtccg gacctagttt aaaagtaaaa cataag 36

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 31
acggaattcc attcaattca aactgga 27

<210> 32
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 32
gatcccgggc cttgtcaatg ctgaatggca a 31

<210> 33
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 33
cggaattcat gagtcttcta accgagg 27

<210> 34
<211> 28
<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 34
gatcccgggc ctccagctct atgctgac 28

<210> 35
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 35
acggaattcc attcaattca aactgga 27

<210> 36
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 36
gatcccgggc cttgtcaatg ctgaatggca a 31

<210> 37
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 37
cggaattcat gagtcttcta accgagg 27

<210> 38
<211> 28
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 38
gatcccgggc atcacttgaa ccgttgca 28

<210> 39
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 39
gatgaattcg acacaatatg tataggctac c 31

<210> 40
<211> 32
<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 40
gatcccgggc tctggattga atggatggga tg 32

<210> 41
<211> 28
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 41
ggggaattca tgaaggcaaa cctaccgg 28

<210> 42
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 42
gatcccgggc gatgcatatt ctgca 25

<210> 43
<211> 28
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 43
gatgaattca tatttggagc cattgccg 28

<210> 44
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 44
gatcccgggc gatgcatatt ctgca 25

<210> 45
<211> 75
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 45
cttactagta tggactacaa ggacgacgat gacaaggaat tcggcggcgg cggctcggcg 60

ctagtgcccg tgggt 75

<210> 46

<211> 66
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 46
cttcacttag tgatggtgat gatggtggtg cccggggctt taaagcttga cggctattcc 60

tccacc 66

<210> 47
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 47
gctaaccatg ttcatgcc 18

<210> 48
<211> 28
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 48
ggggaattca cctctggatt ggatggac 28

<210> 49
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 49
acggaattca tggcgtccca aggcacc 27

<210> 50
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 50
acggaattca ttgtcgtact cctctgcatt g 31

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 51
gagctgaggg agcaattgag 20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 52
gggtgatgaa taccccacag

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Plasmodio de la malaria

<400> 53
Ser Tyr Ile Pro Ser Ala Glu Lys Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un virus recombinante de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), como un agente activo, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en la que el AcNPV recombinante contiene una estructura de secuencia de ADN que presenta una secuencia de ADN de fusión de

(A) una secuencia de ADN que codifica PfCSP de la cepa 3D7 del parásito de la malaria *P. falciparum*, o su fragmento inmunógeno; y

(B) una secuencia de ADN del nº de acceso L22858 de GenBank, que codifica los aminoácidos de la proteína gp64 de baculovirus, o un fragmento de la misma, que es capaz de ser el componente de la partícula vírica;

bajo el control de un promotor dual que comprende el promotor de poliedrina y el promotor de CMV unidos entre sí.

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento de ADN de (A) puede obtenerse mediante una PCR realizada con el ADN genómico extraído de la cepa 3D7 del parásito de la malaria *P. falciparum* como matriz utilizando los cebadores de SEC ID nº: 19 y SEC ID nº: 20, y la segmentación subsiguiente con EcoRI y Cfr9I, y

el fragmento de ADN de (B) es un fragmento que se encuentra presente en el fragmento de ADN que puede obtenerse mediante una PCR realizada con pBACsurf-1 como matriz utilizando los cebadores de SEC ID nº: 7 y SEC ID nº: 8, y la segmentación subsiguiente con RsrII y KpnI.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, que es una vacuna de la malaria.

Fig. 1

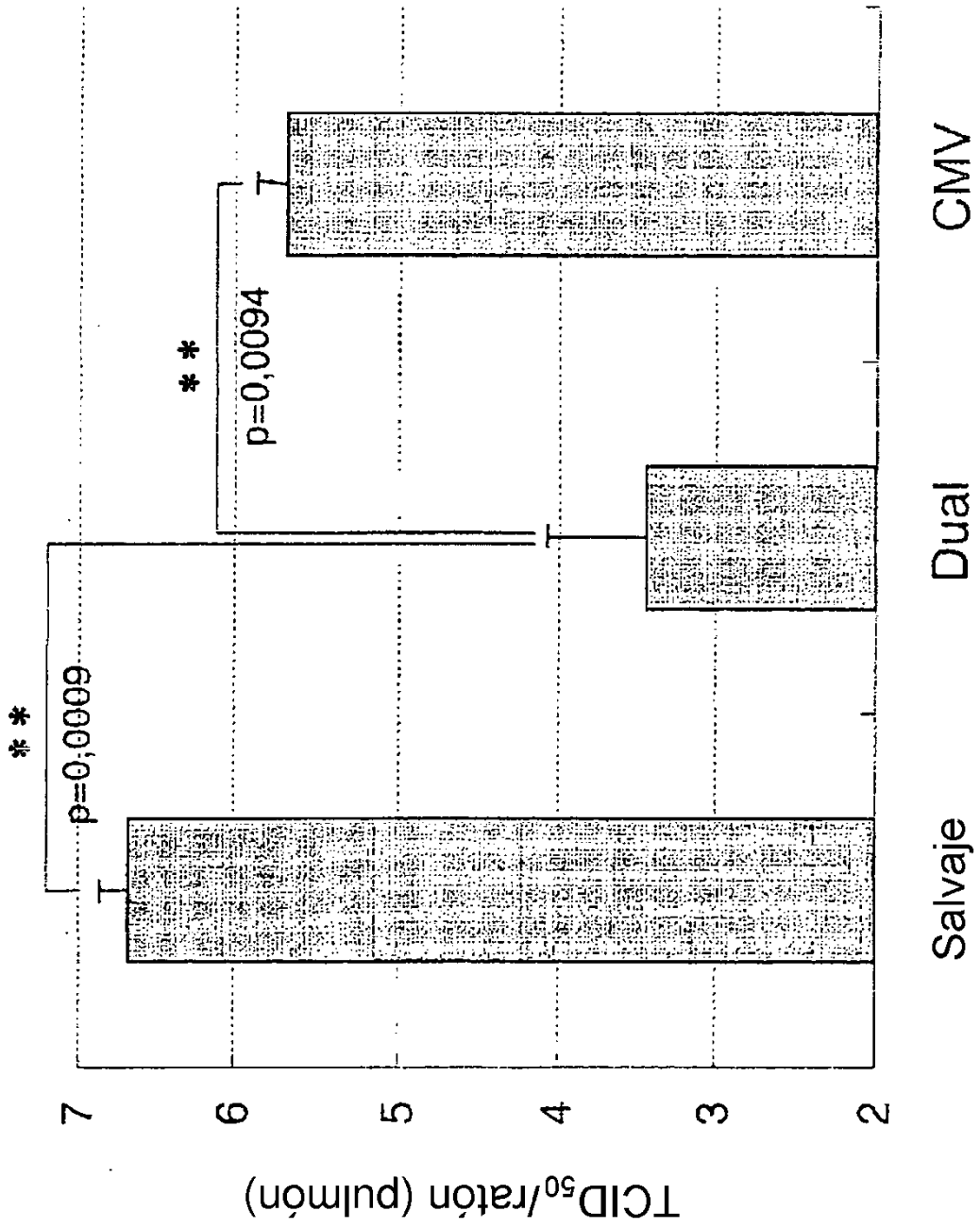


Fig. 2

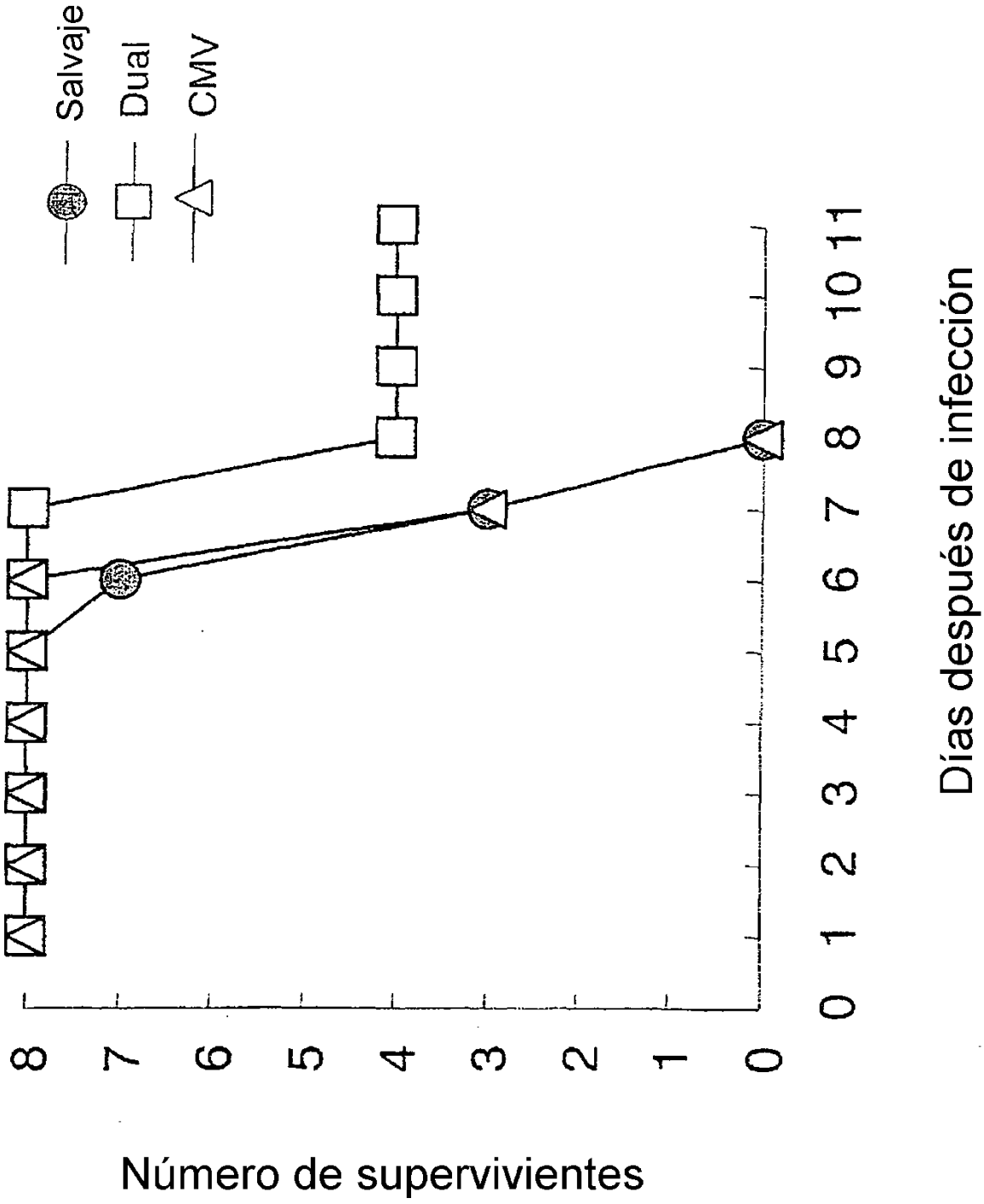

Salvaje
Dual
CMV
8 7 6 5 4 3 2 1 0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Número de supervivientes
Días después de infección

Fig. 3

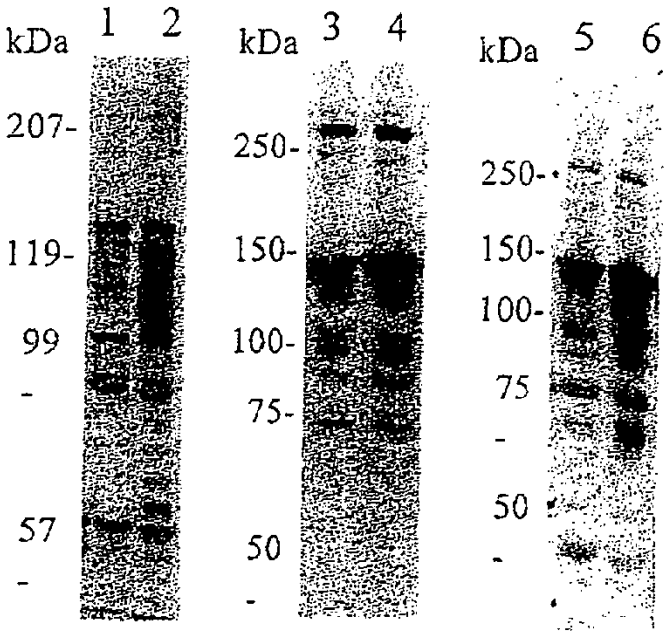

kDa
1
2
207-
119-
99
-
57
-
kDa
3
4
250-
150-
100-
75-
50
-
kDa
5
6
250-
150-
100-
75
-
50
-

Fig. 4

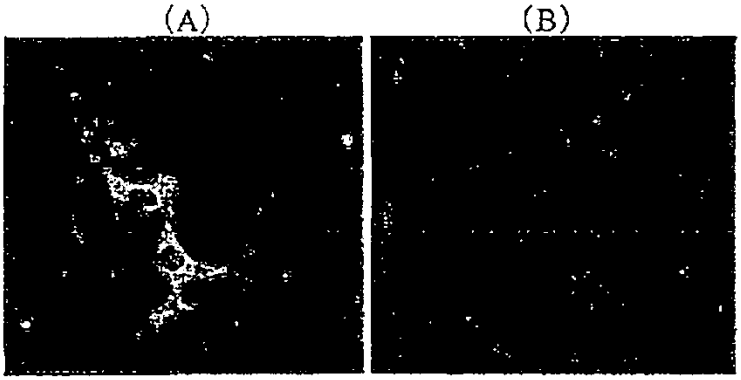

(A)
(B)

Fig. 5

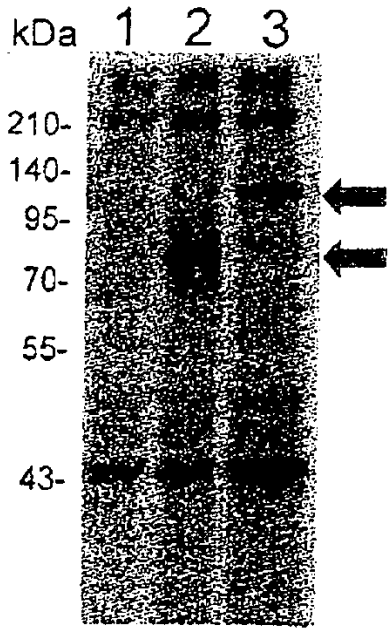


Fig. 6

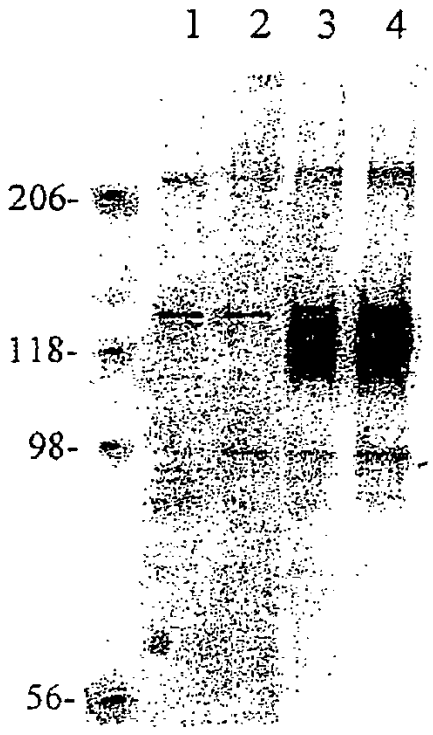


Fig. 7

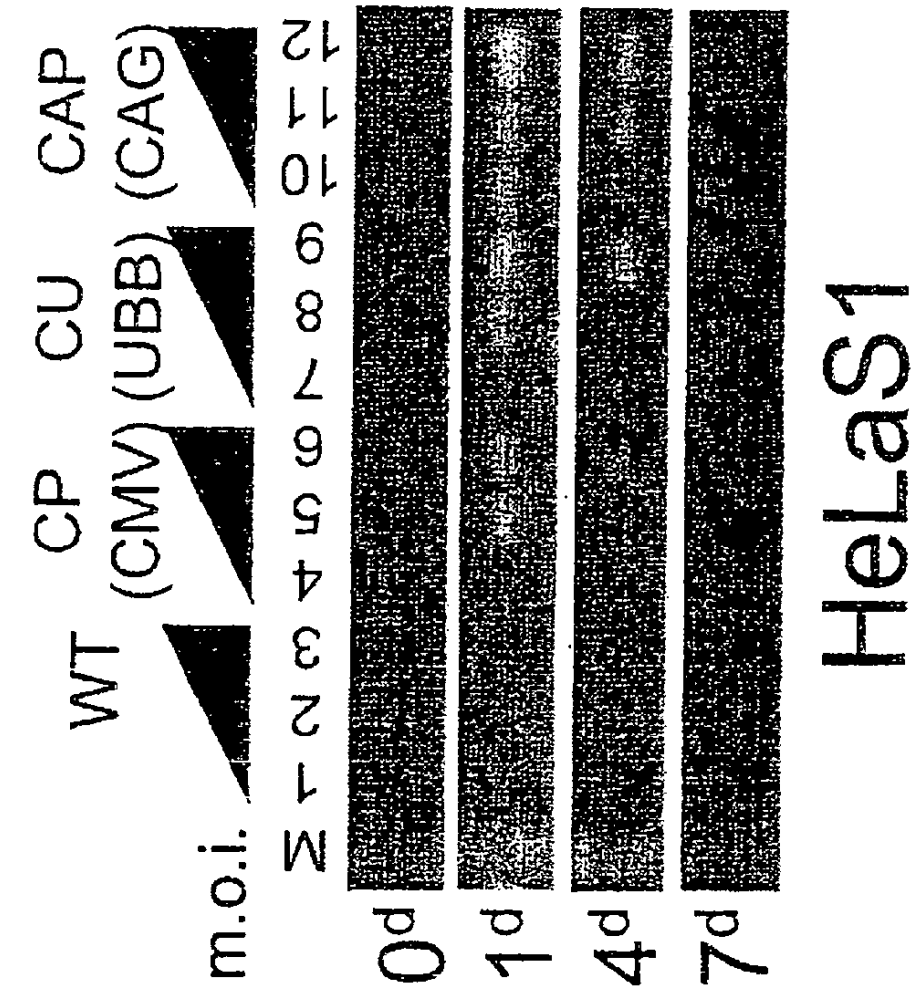

HeLaS1
0d
1d
4d
7d
m.o.i.
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
WT
CP (CMV)
CU (UBB)
CAP (CAG)

Fig. 8

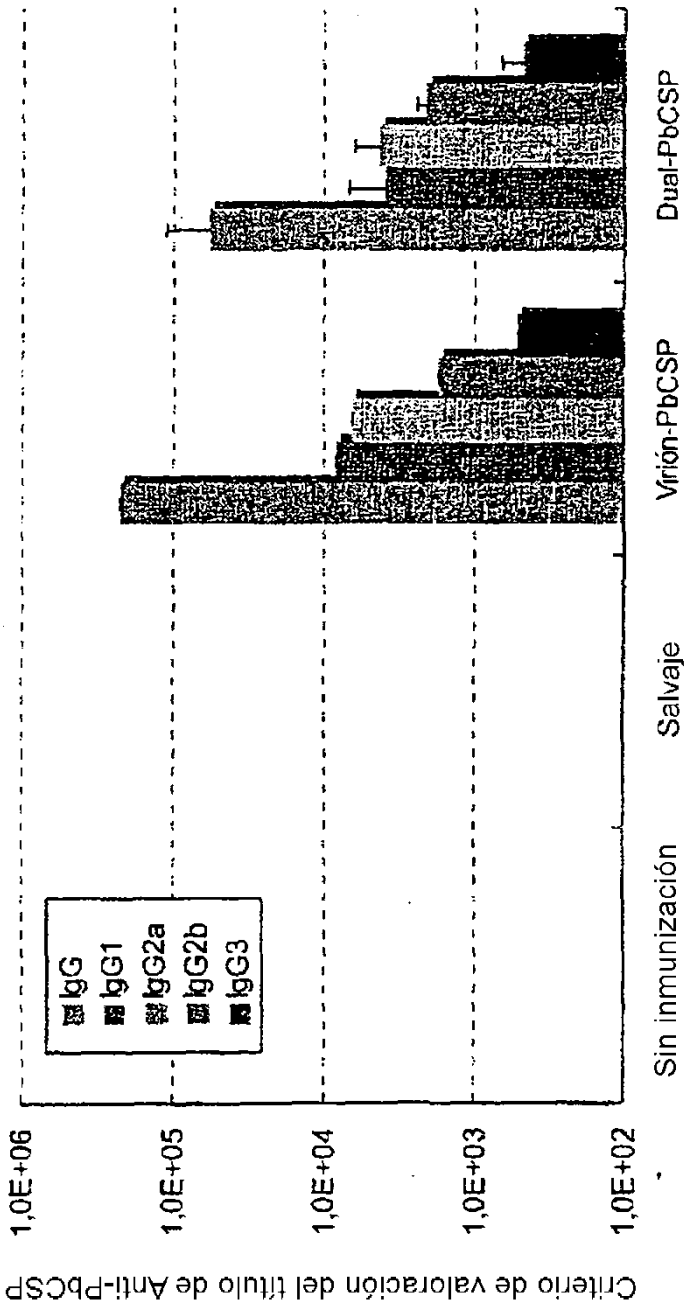

Criterio de valoración del título de Anti-PbCSP
1,0E+06
1,0E+05
1,0E+04
1,0E+03
1,0E+02
IgG
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG3
Sin inmunización
Salvaje
Virión-PbCSP
Dual-PbCSP

Fig. 9

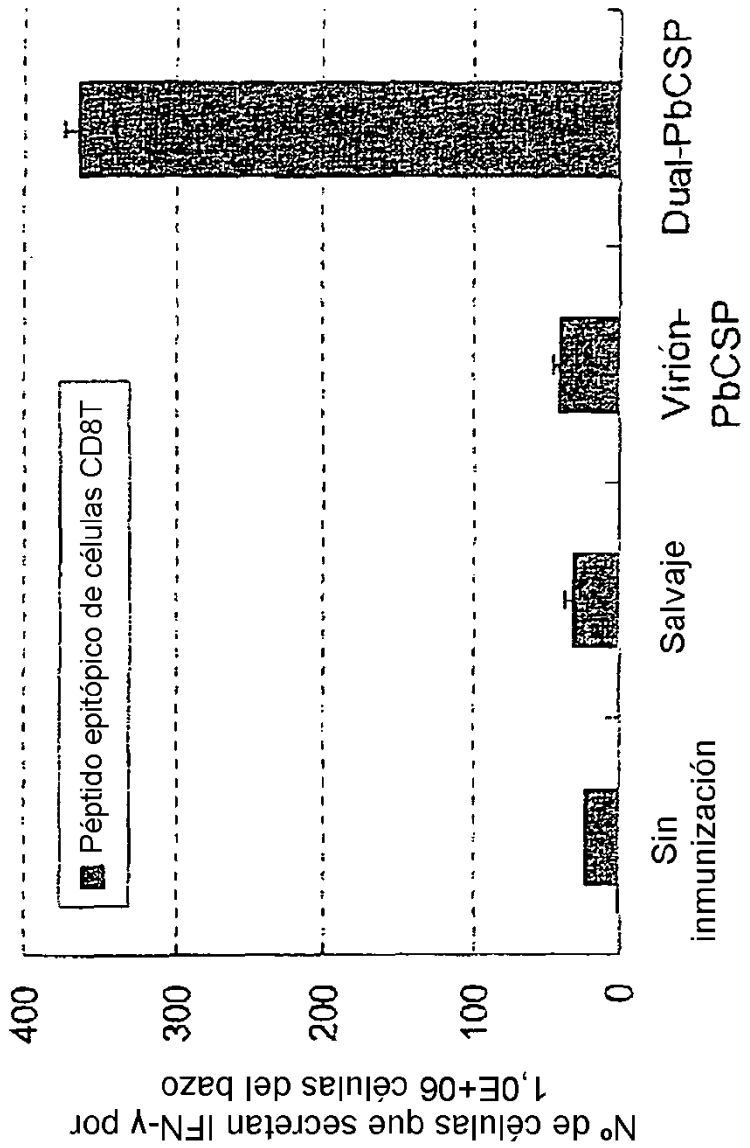

Nº de células que secretan IFN-γ por
1,0E+06 células del bazo
400
300
200
100
0
Péptido epitópico de células CD8T
Sin inmunización
Salvaje
Virión-PbCSP
Dual-PbCSP

Fig. 10

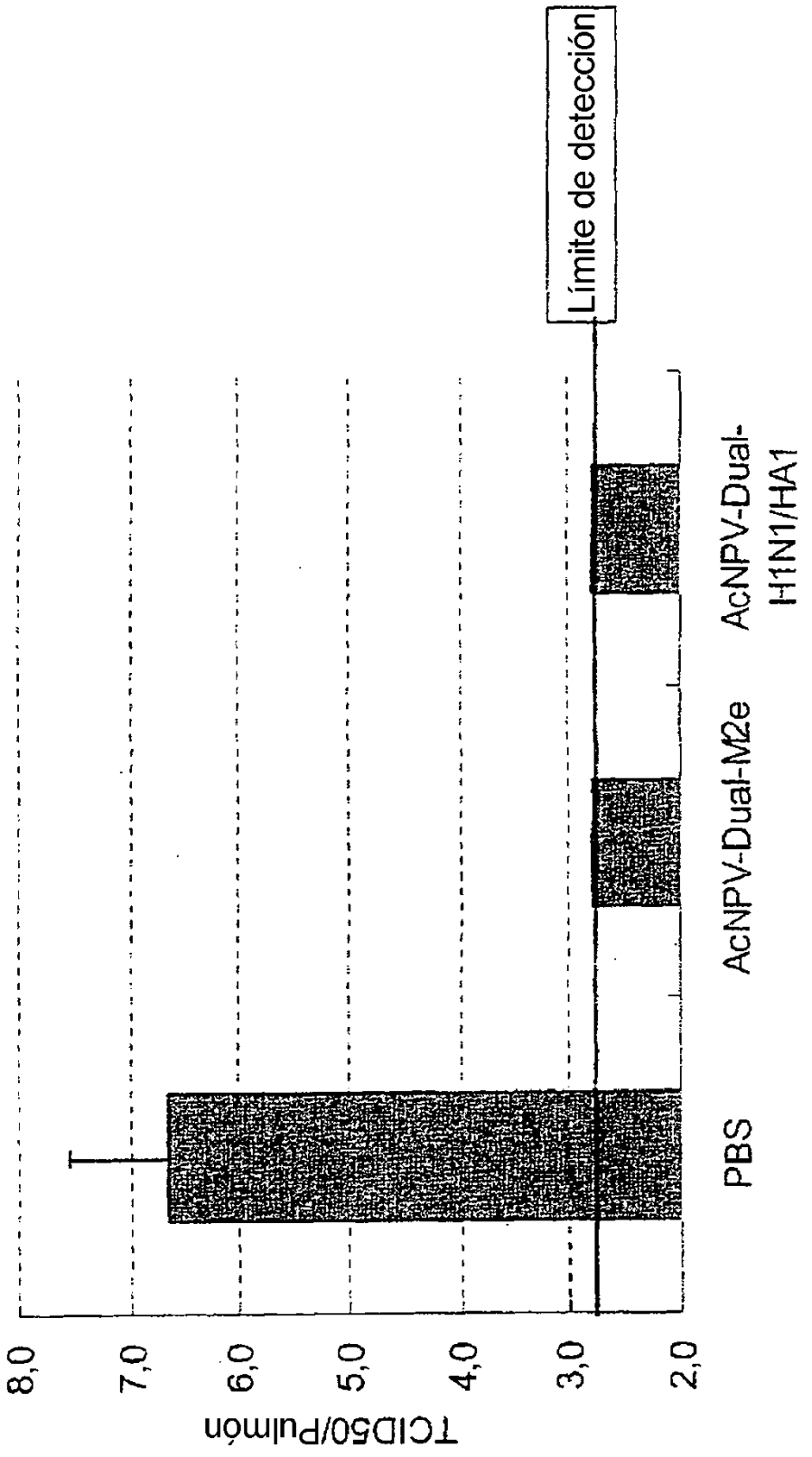

Límite de detección
TCID50/Pulmón
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
PBS
AcNPV-Dual-M2e
AcNPV-Dual-H1N1/HA1

Fig. 11

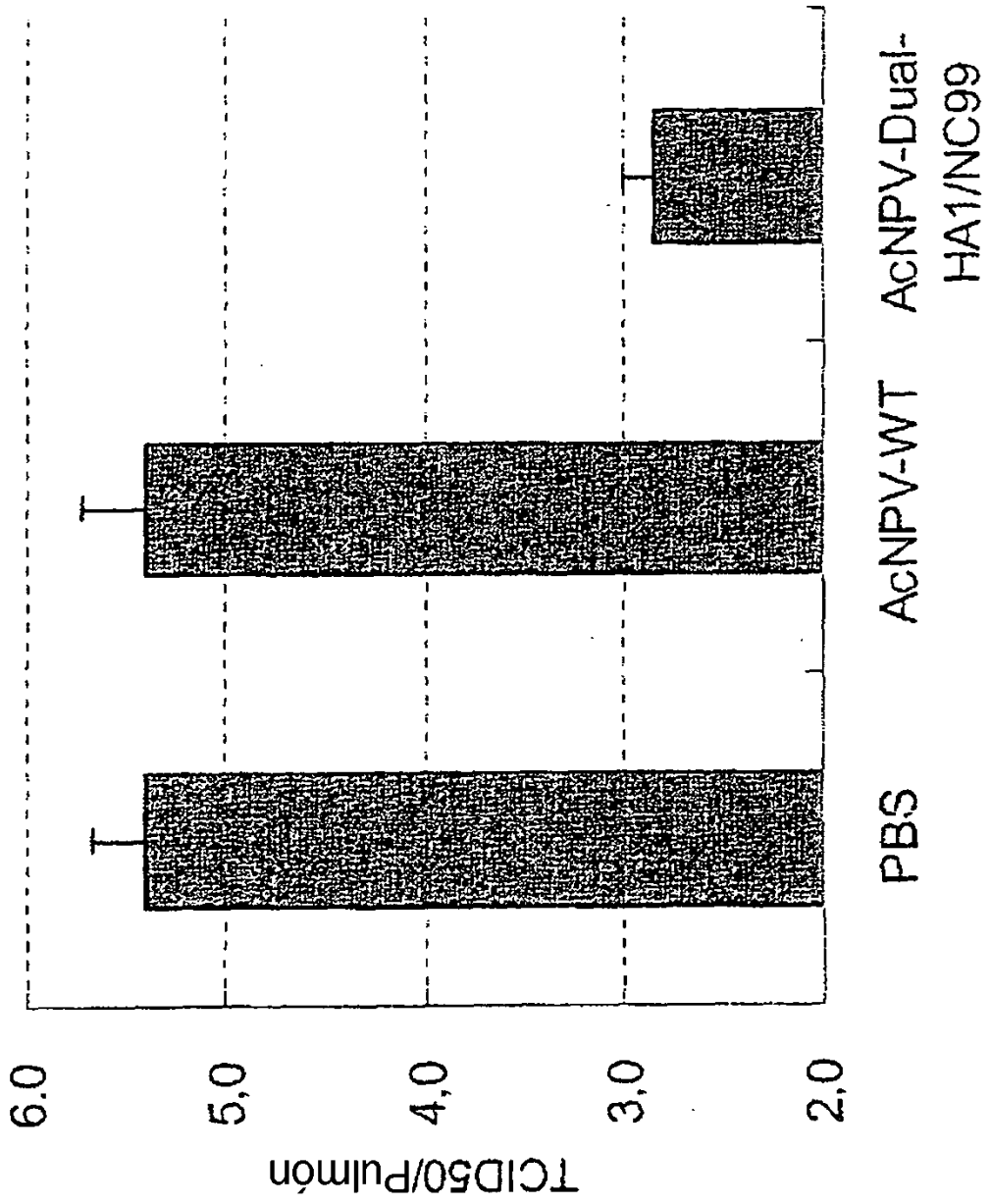


Fig. 12

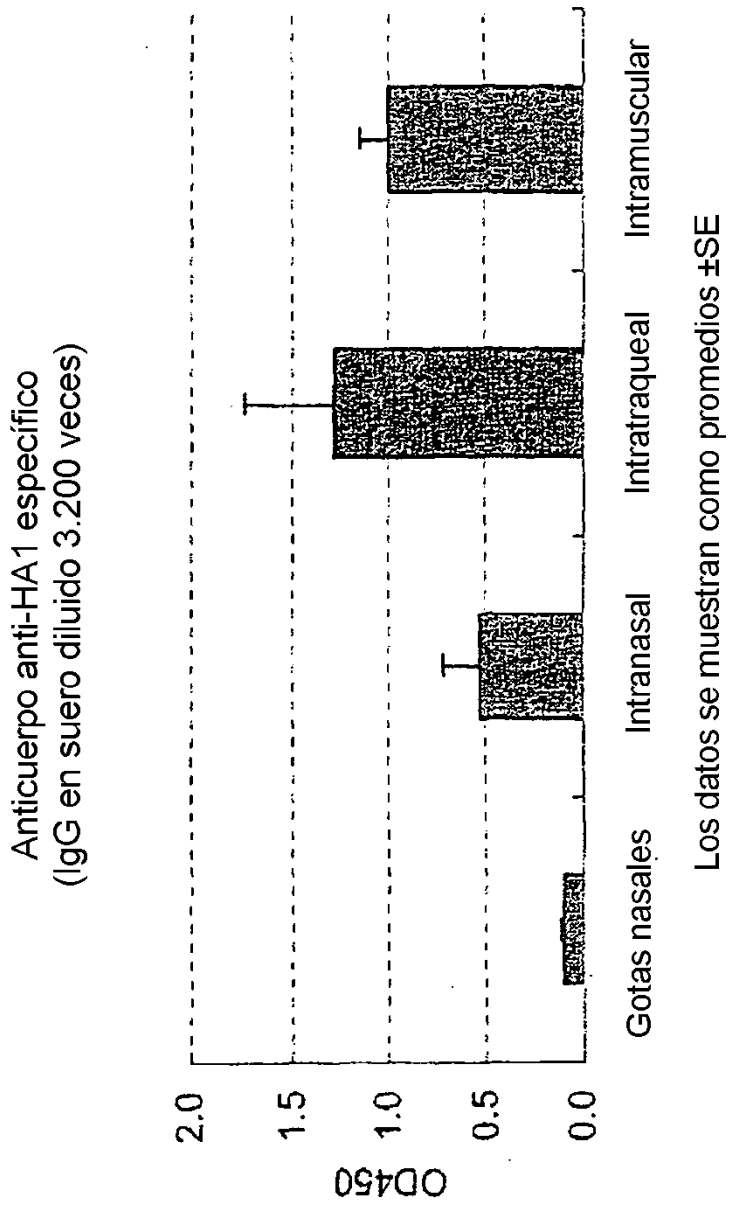

Anticuerpo anti-HA1 específico
(IgG en suero diluido 3.200 veces)
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Gotas nasales
Intranasal
Intratraqueal
Intramuscular
Los datos se muestran como promedios ±SE

Fig. 13

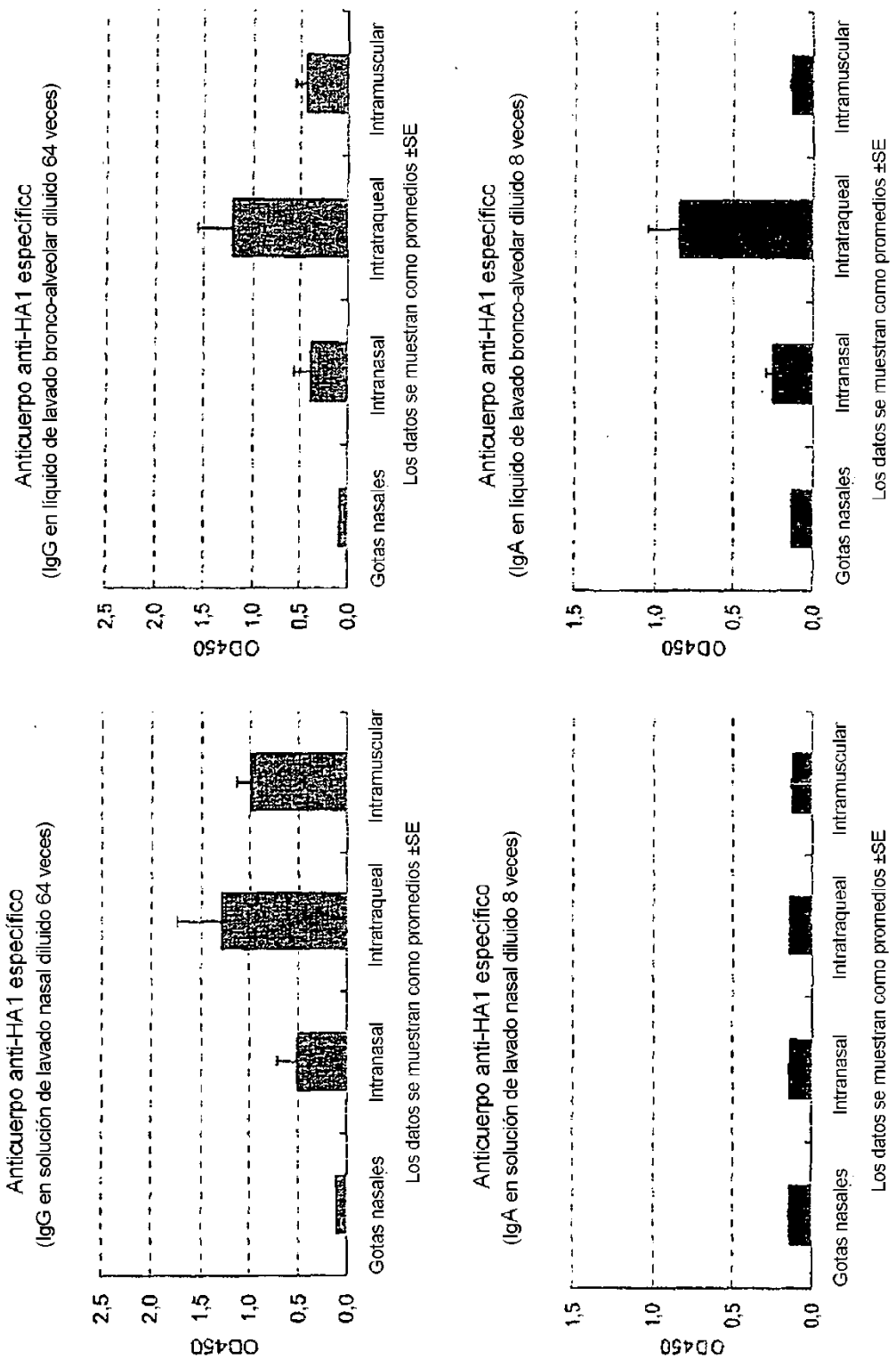

Anticuerpo anti-HA1 específico
(IgG en solución de lavado nasal diluido 64 veces)
OD450
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Gotas nasales
Intranasal
Intratraqueal
Intramuscular
Los datos se muestran como promedios ±SE
Anticuerpo anti-HA1 específico
(IgG en líquido de lavado bronco-alveolar diluido 64 veces)
Anticuerpo anti-HA1 específico
(IgA en solución de lavado nasal diluido 8 veces)
Anticuerpo anti-HA1 específico
(IgA en líquido de lavado bronco-alveolar diluido 8 veces)

Fig. 14

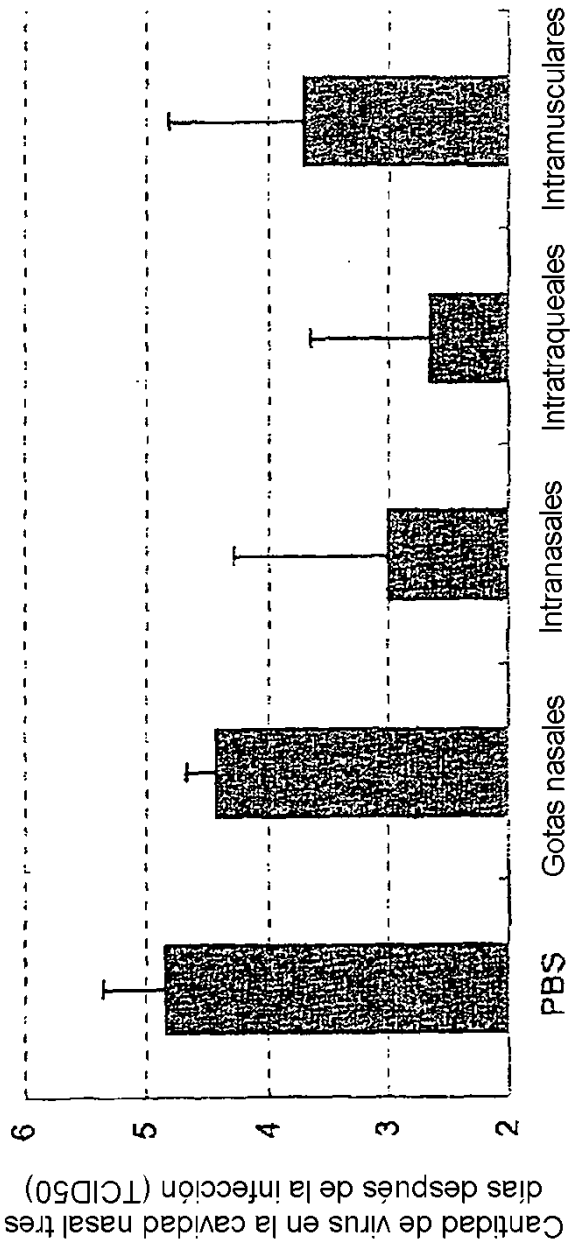
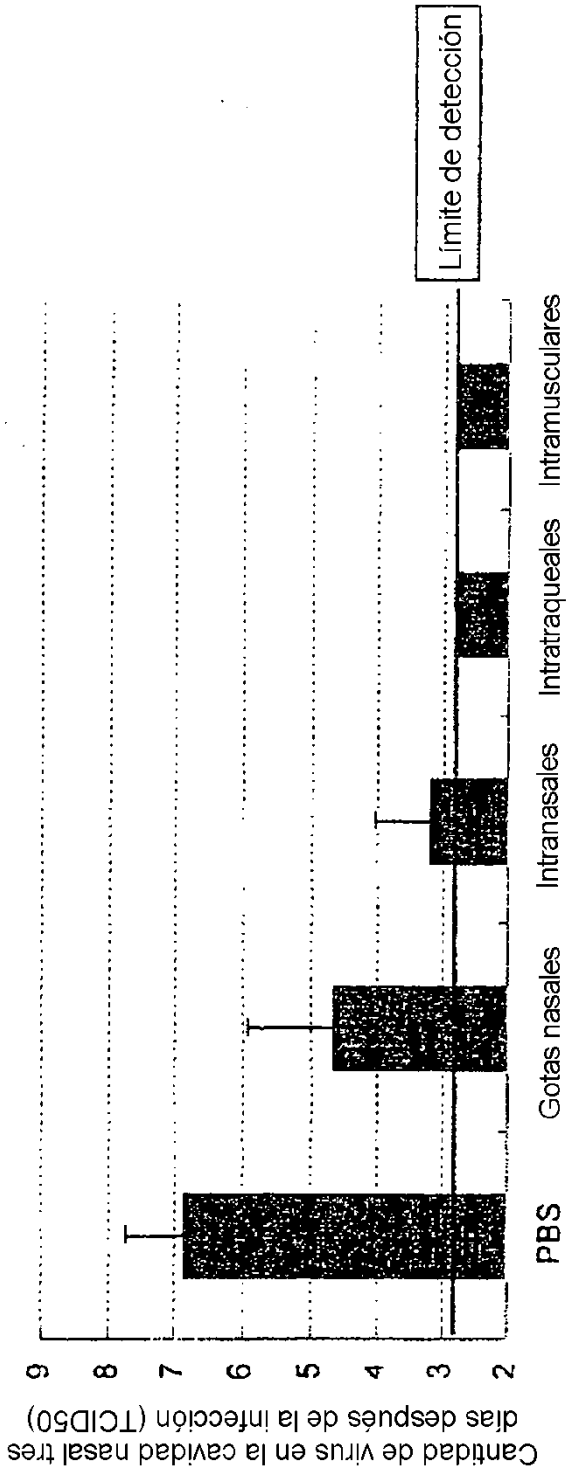

Cantidad de virus en la cavidad nasal tres días después de la infección (TCID50)
6
5
4
3
2
PBS
Gotas nasales
Intranasales
Intratraqueales
Intramusculares

Fig. 15


Límite de detección
PBS
Gotas nasales
Intranasales
Intratraqueales
Intramusculares
9
8
7
6
5
4
3
2
Cantidad de virus en la cavidad nasal tres días después de la infección (TCID50)