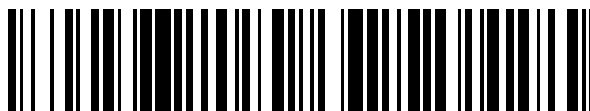


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 654**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/275** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 33/02** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08877836 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2352520**

54 Título: **Vacunación con vectores poxvirales mediante alteración mecánica epidérmica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.10.2015**

73 Titular/es:

**TREMRX, INC. (100.0%)  
155 Seaport Boulevard  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**KUPPER, THOMAS, S. y  
LIU, LUZHENG, LISA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 547 654 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vacunación con vectores poxvirales mediante alteración mecánica epidérmica

### Investigación patrocinada por el gobierno

5 La presente invención se realizó en parte con subvención gubernamental con los números de concesión U19 AI057330 y 5U54AI057159-05 del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) del National Institute of Health (NIH). El gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos relacionados con la presente invención.

### Antecedentes de la invención

10 Las vacunas están tradicionalmente constituidas por patógenos vivos, atenuados, organismos completos inactivados o toxinas inactivadas. En muchos casos estas estrategias han sido satisfactorias en la inducción de la inmunoprotección basada en respuestas mediadas por anticuerpos. Sin embargo, determinados patógenos, por ejemplo, el VIH, VHC, TB, la malaria y el cáncer requieren la inducción de inmunidad mediada por células (IMC). Generalmente las vacunas no vivas han demostrado ser ineficaces en la producción de IMC. Además, aunque las vacunas vivas puedan inducir IMC, algunas vacunas vivas atenuadas pueden producir enfermedades en sujetos  
15 inmunosuprimidos.

Por lo tanto, hay una necesidad insatisfecha de vacunas que sean más eficaces y de medios para administrarlas que sean más eficaces que den como resultado una eficacia terapéutica y una respuesta inmunoprotectora potenciadas.

20 El documento WO 2004/058278 se refiere a un vector de poxviral recombinante, tal como un vector del virus de la vacuna, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la IL-15, una citocina que estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos T *in vitro* y que puede aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T *in vivo*.

25 Hodge y col (1999) Cancer Research 59; 5800-5807 describen la administración de un virus de vacuna recombinante que expresa el antígeno carcinoembrionario humano (ACE) con una, tres o ninguna molécula coestimuladora a ratones mediante la escarificación en la cola induciendo una respuesta de linfocitos T específica de ACE.

### Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 Los virus de vacunas atenuadas, con replicación deficiente, tales como la cepa Ankara del virus de la vacuna modificado (MVA), se han propuesto previamente como vectores prometedores de vacunas virales vivas debido a su magnífico perfil de seguridad e inmunogenicidad y se han sometido a ensayos en estudios tanto clínicos como preclínicos. Sin embargo, vacunas virales, tales como MVA, se han administrado exclusivamente mediante vías de inyección, y hasta ahora, nunca mediante escarificación cutánea. Esto puede deberse a la suposición de que para el desarrollo de lesión por viruela y fuerte protección posterior contra la exposición antigénica se requiere replicación viral en la epidermis. Sin embargo, los inventores inmunizaron ratones con el MVA mediante escarificación cutánea  
35 y, para su sorpresa, la escarificación cutánea con MVA indujo lesiones características de viruela de una manera dependiente de la dosis y generó respuestas inmunitarias humorales y celulares dependientes de la dosis contra antígenos del virus de la vacuna (VV). Sin pretender quedar ligado a ningún mecanismo o teoría particular, los inventores creen que para suscitar una fuerte respuesta inmunitaria a través de inmunización mediante escarificación cutánea no se requiere replicación viral.

40 La escarificación cutánea con MVA proporciona protección completa contra mortalidad y enfermedad en ratones expuestos a infección con el virus de la vacuna intranasal de la Reserva Occidental (WR-VV) a una dosis a la cual la inmunización VV replicativa mediante las vías de inyección convencionales fracasaban en la protección de ratones a la exposición letal. A una dosis comparable de inmunización con MVA, las vías de inyección convencionales solo suscitan respuestas de anticuerpos y de linfocitos T débilmente detectables, incluso después de exposición viral secundaria y ofrecen mala protección contra la exposición intranasal al WR-VV, mientras que se obtuvo una fuerte  
45 inmunoprotección mediante escarificación cutánea con cualquiera del MVA o VV. Por tanto, la inmunización epidérmica con vacunas virales vivas, tales como poxvirus con replicación deficiente, (por ejemplo, MVA), usando alteración mecánica de la piel, genera una respuesta inmunitaria más fuerte y una protección más fuerte del huésped inmunizado a una dosis mucho menor en comparación con las vías de inyección actualmente usadas en la clínica, que requieren altas dosis y regímenes de inyección múltiples.

50 En el presente documento se desvela un nuevo procedimiento para la inmunización de un sujeto contra infecciones (o trastornos o enfermedades infecciosas) o cáncer, usando un vector poxviral modificado con replicación deficiente que contiene antígenos aplicado a la epidermis del sujeto mecánicamente alterada. Pueden usarse virus variantes de vacuna que se modifican para que tengan una replicación deficiente o menos infecciosa que se han modificado genéticamente para que contengan los ADNc que codifican el antígeno (o antígenos).  
55

- También se desvela un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria. El procedimiento comprende administrar a un sujeto un poxvirus vivo, modificado, no replicante o con replicación deteriorada que comprende un antígeno en una cantidad suficiente para estimular la respuesta inmunitaria, en la que el poxvirus se administra a una epidermis del sujeto mecánicamente alterada. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral y/o una respuesta celular. La respuesta celular puede suscitarse mediante linfocitos T CD4+ y/o CD8+ y/o linfocitos B.
- Un aspecto de la invención proporciona un poxvirus vivo, modificado, no replicante que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno peptídico o polipeptídico que es exógeno al poxvirus, en el que el poxvirus infecta las células humanas pero no es replicante en las células humanas; para su uso en un procedimiento para suscitar una respuesta inmunitaria de linfocitos T de memoria contra el antígeno exógeno, administrando el poxvirus a una epidermis de un sujeto mecánicamente alterada de tal manera que el poxvirus que expresa el antígeno exógeno infecte la epidermis alterada y suscite una respuesta inmunitaria de linfocitos T de memoria.
- El poxvirus puede ser orthopoxvirus, suipoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, parapoxvirus, moluscopoxvirus o yatapoxvirus. En algunas realizaciones, el poxvirus es TRICOM™.
- En algunas realizaciones, el orthopoxvirus es un virus de la vacuna. El virus de la vacuna puede ser la cepa Ankara del virus de la vacuna modificado (MVA), la cepa WR, la cepa NYCBH, la cepa Wyeth, ACAM2000, la cepa Lister, LC16m8, Elstree-BNm, la cepa Copenhagen o la cepa Tiantan.
- La epidermis puede alterarse mecánicamente mediante una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica, o un dispositivo abrasivo. La epidermis puede alterarse mecánicamente esencialmente al mismo tiempo que la administración del poxvirus o antes de la administración del poxvirus.
- En algunas realizaciones, el sujeto tiene o corre el riesgo de desarrollar cáncer. El cáncer puede ser cáncer de piel, de mama, de próstata, de cerebro, de pulmón, de ovario, de hígado, de páncreas, de estómago, de riñón, de vejiga y cáncer tiroideo o colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer es adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, cáncer de ovario de origen epitelial, adenocarcinoma y leiomiomasarcoma colorrectal, adenocarcinoma y leiomiomasarcoma de estómago, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, adenocarcinoma ductal de páncreas, tumores pancreáticos endocrinos, carcinoma de células renales, carcinoma de células transicionales de riñón y vejiga, carcinoma de células escamosas de vejiga, cáncer tiroideo papilar, cáncer tiroideo folicular, astrocitoma o glioblastoma multiforme. El cáncer de piel puede ser melanoma, carcinoma de células escamosas cutáneas o carcinoma de células basales.
- En algunas realizaciones, el sujeto tiene o corre el riesgo de desarrollar una infección. La infección puede ser una infección viral bacteriana, fúngica o protozoaria. Los ejemplos de infecciones virales incluyen, pero sin limitación, el VIH, el virus de la gripe, el virus del dengue, el virus de la Hepatitis A, el virus de la Hepatitis B, el virus de la Hepatitis C, el papilomavirus humano, el virus del Ebola, el virus de Marburg, el virus de la Rabia, el virus del Hanta, el virus del Nilo Occidental, los Coronavirus de tipo SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo), el virus del herpes simple, el virus de la Varicela zóster, el virus de Epstein-Barr, el herpesvirus Humano 8, los Alfavirus y la encefalitis de St. Louis.
- La infección bacteriana puede ser por *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Rickettsia typhi*, o *Treponema pallidum*.
- Los ejemplos de infecciones fúngicas incluyen, pero sin limitación, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, y especies de *Aspergillus*.
- Los ejemplos de infecciones protozoarias incluyen, pero sin limitación, Malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), especies de *Leishmania*, especies de *Trypanosoma* (africano y americano), un *cryptosporidium*, especies de *Isospora*, *Naegleria fowleri*, especies de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Toxoplasma gondii*, y *Pneumocystis carinii*.
- En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a tumor (AAT), un antígeno específico de tumor (AET), o un antígeno específico de tejido. El AAT, AET o antígeno específico de tejido puede ser mucina 1 (MUC1), mucina 2 (MUC2), BAGE-1, GAGE-1~8; GnTV, HERV-K-MEL, KK-LC-1, KM-HN-1, LAGE-1, MAGE-A1~A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-C3, NA88, NY-ESO-1 / LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-2, SSX-4, TAG-1, TAG-2, TRAG-3, TRP2-INT2, XAGE-1b, antígeno carcinoembrionario (ACE), CA-125, gp100 / Pmel17, Calicreína 4, mamaglobina-A, Melan-A / MART-1, NY-BR-1, OA-1, antígeno prostático específico (PSA), RAB38 / NY-MEL-1, TRP-1 / gp75, TRP-2, tirosinasa, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMena), Ep-CAM, EphA3, EZH2, FGF5, G250 / MN / CAIX, HER-2 / neu, IL13Ralfa2, carboxil esterasa Intestinal, alfa-fetoproteína (AFP), M-CSF, MC-SP, mdm-2, MMP-2, MUC1, PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RGS5, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1, survivina, Telomerasa, VEGF, WT1, alfa-actinina-4, ARTC1, proteína de fusión BCR-ABL, B-RAF, CASP-5, CASP-8, beta-catenina, Cdc27, CDK4, CDKN2A, COA-1, proteína de fusión dekan, EFTUD2, factor de Elongación 2, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasa AS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, MART2, ME1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, neo-PAP, Miosina de clase I, NFYC, OGT, OS-9, p53, proteína de fusión pml-RARalfa, PRDX5, PT-PRK, K-ras, N-ras,

RBAF600, SIRT2, SNRPD1, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TGF-betaRII o Triosafosfato Isomerasa.

En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno viral, bacteriano, fúngico o protozoario. El antígeno puede ser la Gag del VIH, la proteasa, la transcriptasa inversa, la proteína de envoltura de longitud completa, Vpu, Tat y Rev; la hemaglutinina gripal, la nucleoproteína, la proteína de matriz 1 (M1), la proteína 1 no estructural (NS-1); un antígeno de protección cruzada del virus del dengue que comparten todos los serotipos principales de virus (por ejemplo, la proteína 1 no estructural o NS1, el dominio de envoltura III o DEIII), la proteína 1 capsidial del virus de la Hepatitis A (PV-1), el antígeno de superficie (HBsAg) y el antígeno del núcleo (HB-cAg) del virus de la Hepatitis B, el antígeno del núcleo de la Hepatitis C, las proteínas E1, E2, p7, NS2, NS4 y NS4, E1, E2, L1, L2 del HPV, la glucoproteína, nucleoproteína y proteína de matriz del virus del Ébola y de Marburg, la glucoproteína del virus de la Rabia, la nucleoproteína, la glucoproteína de envoltura del virus Hanta y la proteína G1, las glucoproteínas de la envoltura (E) y de la premembrana (prM) del virus del Nilo Occidental, la Orf 3 de Coronavirus de tipo SARS, la proteína Spike, la proteína de la Nucleocápside y Membrana, la glucoproteína B y D del Herpesvirus simple; la glucoproteína E y B (gE, gB) de la envoltura del virus de la Varicela-zoster, la proteína 63 temprana inmediata (IE63), la gp350 del virus de Epstein-Barr, la gp110, el antígeno nuclear 1 (EBNA-1), EBNA 2 y EBNA-3C, la proteína de control del complemento (KCP) del herpesvirus Humano 8 de, la glucoproteína B, la ORF6, ORF61 y ORF65), el antígeno de la *M. tuberculosis* 85A, 85B, MPT51, PPE44, la proteína de choque térmico micobacteriana de 65 kDa (AND-hsp65), la diana antigénica secretora temprana de 6 kDa (ESAT-6), la SpaO de *Salmonella*, H1a, las proteínas de membrana externa (PME), las PME de *P. aeruginosa*, PcrV, OprF, OprI, PilA y ToxA mutada, el antígeno protector (AP) de *B. anthracis*, la proteína V de respuesta a bajos niveles de calcio (LcrV) de *Y. pestis*, F1 y la proteína de fusión F1-V, la lipoproteína asociada a péptidoglucano (LAP) de *Legionella*, mip, flagelos, OmpS, hsp60, la proteína secretora principal (PSP), el factor de actividad similar a la proteasa de *Chlamydia* (FAPC), la proteína de membrana externa principal (PMEP), las lipoproteínas de membrana externa de *T. pallidum*, Ag2/Pra106 de *Coccidioides*, Prp2, fosfolipasa (P1b), alfa-manosidasa (Amn1), aspartil proteasa, Gel1, adhesina de superficie WI-1 de *Blastomyces dermatitidis*, GMX de *Cryptococcus neoformans*, mimotopos peptídicos o manoproteínas de GMX de *Cryptococcus neoformans*, hsp90-CA de *Candida albicans*, la manoproteína de 65-kDa (MP65), la aspartil proteinasa Secretora (Sap), Als1p-N, Als3p-N, Asp f 16, Asp f 2, Der p 1, y Fel d 1 de *Aspergillus*, rodlet A, PEP2, HSP90 de *Aspergillus*, catalasa de 90-kDa, el antígeno 1 de membrana apical de *Plasmodium* (AMA1), la proteína de fase sexual de 25-kDa (Pfs25), la proteína 1 de membrana eritrocitaria (PfEMP1), la proteína de circumsporozoito (CSP), la Proteína 1 de Superficie de Merozoito (MSP1), cisteína proteinasa de tipo III (CPC) de *Leishmania*, proteínas ribosomales (LRP), el antígeno A2, histonas nucleosomales, HSP20, la proteína de superficie de promastigoto G46/M-2/PSA-2, el antígeno LACK de *L. infantum*, GP63, LmST11, TSA, P4, NH36, papLe22, beta tubulina de *Tripanosoma* (STIB 806), la proteína asociada a microtúbulos (PAM p15), cisteína proteasas (CP), proteínas de superficie de *Cryptosporidium* gp15 y gp40, el antígeno Cp23, p23, el antígeno 1 de superficie de *Toxoplasma gondii* (TgSAG1), el inhibidor 1 de proteasa (TgPI-1), las proteínas asociadas a superficie MIC2, MIC3, ROP2, GRA1-GRA7, la glucoproteína de superficie principal (MSG) de *Pneumocystis carinii*, el antígeno p55, los antígenos Sm14, 21.7 y SmFim de *Schistosomiasis mansoni*, la Proteína Tegumentaria Sm29, la GST de 26 kDa, las SjCTPI, SjC23, Sj22.7, o SjGST-32 de *Schistosoma japonicum*.

En algunas realizaciones, los procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria, descritos en el presente documento, comprenden adicionalmente administrar una molécula coestimuladora, un factor de crecimiento, un adyuvante y/o una citocina. Los ejemplos de moléculas coestimuladoras, factores de crecimiento, adyuvantes o citocinas incluyen, pero sin limitación, IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27, B7-1, B7-2, LFA-3, B7-H3, CD40, CD40L, ligando ICOS, OX-40L, 4-1BBL, GM-CSF, SCF, FGF, ligando Flt3, CCR4, QS-7, QS-17, QS-21, oligonucleótidos CpG, ST-246, AS-04, mutante LT R192G, Montanide ISA 720, proteínas de choque térmico, cofactor micobacteriano sintético (CAF01), miméticos de Lípido A, serovariedad de *Salmonella enterica*, flagelina de *Typhimurium* (FlC), Montanide 720, Levamisol (LMS), Imiquimod, Toxina Diftérica, IMP321, AS02A, AS01B, AS15-SB, Alhidrogel, Montanide ISA, hidróxido de aluminio, MF59, IS-COMATRIX, MLPA, MPL y otros ligandos de TLR-4, MDP, otros ligandos de TLR-2, AS02A, AS01B, y Toxinas Termoestables LTK63 y LT-R192G.

El poxvirus puede expresar la molécula coestimuladora con el antígeno. La molécula coestimuladora coexpresada puede ser IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27, B7-2, B7-H3, CD40, CD40L, el ligando ICOS, OX-40L, 4-1BBL, GM-CSF, SCF, FGF, el ligando Flt3, o CCR4.

La molécula coestimuladora, el factor de crecimiento, el adyuvante y/o la citocina pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo que el antígeno, o pueden administrarse antes o después de la administración del antígeno. La molécula coestimuladora, el factor de crecimiento, el adyuvante y/o la citocina pueden administrarse esencialmente en el mismo lugar que el antígeno, o pueden administrarse en un lugar diferente al del antígeno.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender adicionalmente una segunda administración del antígeno en el momento después de la primera administración del antígeno.

El poxvirus no replicante o con replicación defectuosa comprende un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno. El ácido nucleico que codifica el antígeno puede estar unido operativamente a un promotor. El promotor puede ser un promotor constitutivamente activo o un promotor inducible. Adicionalmente el promotor puede comprender un potenciador u otro elemento regulador transcripcional (ERT).

En algunas realizaciones el sujeto no se ha expuesto al antígeno antes de la administración del poxvirus que comprende el antígeno y el sujeto corre el riesgo de exponerse al antígeno. En estas realizaciones, la estimulación de la respuesta inmunitaria confiere protección al sujeto contra una enfermedad causada por un agente que presente el antígeno.

- 5 En algunas realizaciones el sujeto se ha expuesto al antígeno antes de la administración del poxvirus que comprende el antígeno. En estas realizaciones, la estimulación de la respuesta inmunitaria trata una enfermedad en el sujeto causada por un agente que presenta el antígeno.

En algunas realizaciones, la estimulación de la respuesta inmunitaria protege de o trata la enfermedad. La enfermedad puede ser un cáncer o una infección. El cáncer puede ser melanoma, carcinoma de células escamosas cutáneas, carcinoma de células basales, cáncer de mama, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, cáncer de ovario de origen epitelial, adenocarcinoma y leiomioma colorrectal, adenocarcinoma y leiomioma de estómago, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, adenocarcinomas ductales de páncreas, tumores pancreáticos endocrinos, carcinoma de células renales, carcinoma de células transicionales de riñón y vejiga, carcinoma de células escamosas de la vejiga, cáncer tiroideo papilar, cáncer tiroideo folicular, astrocitoma o glioblastoma multiforme.

La infección puede ser una infección viral, bacteriana, fúngica o protozoaria. La infección puede ser una infección causada por el VIH, el virus de la gripe, el virus del dengue, el virus de la Hepatitis A, de la Hepatitis B, de la Hepatitis C, el papilomavirus humano, el virus del Ebola, de Marburg, de la Rabia, de Hanta, el virus del Nilo Occidental, los Coronavirus de tipo SARS, el virus del herpes simple, el virus de la Varicela zoster, el virus de Epstein-Barr, el herpesvirus Humano 8, los Alfavirus, la encefalitis de St. Louis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Rickettsia typhi*, *Treponema pallidum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, especies de *Aspergillus*, Malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), especies de *Leishmania*, especies de *Trypanosoma* (africano y americano), un cryptosporidium, especies de *Isospora*, *Naegleria fowleri*, especies de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Toxoplasma gondii* o *Pneumocystis carinii*.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan kits. El kit comprende un dispositivo para alterar la epidermis de un sujeto y administrar un poxvirus vivo, modificado, no replicante, como se define en las reivindicaciones. El dispositivo puede ser una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica o un abrasivo.

El poxvirus puede adjuntarse al dispositivo o mezclarse en una solución. Adicionalmente la solución puede comprender un agente que potencie la liberación del poxvirus en el sujeto a través de la epidermis del mismo. La solución puede comprender adicionalmente un agente que potencie una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Los kits descritos en el presente documento pueden comprender adicionalmente instrucciones para su uso.

Cada una de las limitaciones de la invención puede incluir diversas realizaciones de la misma. Por tanto, se espera que cada una de las limitaciones de la invención, que implique cualquiera de un elemento o combinaciones de elementos, puede incluirse en cada uno de los aspectos de la invención. La presente invención no se limita en esta solicitud a los detalles de construcción y a las disposiciones del conjunto de componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención puede tener otras realizaciones y puede llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras. Además, la fraseología y terminología usada en el presente documento tiene la intención de describir y no debe considerarse que es limitante. El uso de las expresiones “que incluye”, “que comprende”, o “que tiene”, “que contiene”, “que implica” y variaciones de las mismas, del presente documento, significa que incluye los componentes indicados en lo sucesivo y sus equivalentes así como componentes adicionales.

#### 45 **Breve descripción de los dibujos**

FIG. 1. La inoculación con el virus de la vacuna mediante escarificación cutánea es superiormente inmunogénica en comparación con otras vías de inmunización. Ratones C57BL/6 (B6) se inmunizaron con VV a una dosis de  $2 \times 10^6$  ufp mediante las vías indicadas. e.c.: escarificación cutánea; i.p.: inyecciones intraperitoneales; s.c.: inyecciones subcutáneas; i.d.: inyección interdérmica; i.m.: inyección intramuscular. (a) Respuesta de linfocitos T primaria: los esplenocitos recogidos el día 7 tras la inmunización (p.i.) se estimularon con células diana infectadas con VV (esplenocitos de ratones sin tratar) durante 6 horas en presencia de Brefeldin A para medir la frecuencia de linfocitos T CD8 productores de IFN- $\gamma$  mediante tinción con citocina intracelular. No I: ratones no inmunizados. (b) la actividad de linfocitos T de memoria específicos de VV se evaluó a las 5 semanas p.i. Los esplenocitos de ratones inmunizados se reestimularon con células diana infectadas con VV durante 48 h y se recogió el sobrenadante. La producción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante se midió mediante ELISA. (c-d). El nivel de IgG específico de VV en suero se determinó a los momentos indicados p.i. por ELISA.

FIG. 2. La escarificación cutánea con VV condujo a una protección superior contra la exposición cutánea secundaria al virus en comparación con otras vías de inmunización. Ratones B6 se inmunizaron con VV

mediante diversas vías como se indica.

Ocho semanas después de la inmunización, los ratones inmunizados se expusieron a infección VV cutánea secundaria. Seis días después de la exposición, se midió la carga viral en el lugar expuesto mediante PCR en tiempo real. Los ratones no inmunizados se incluyeron como control.

5 FIG. 3. La escarificación cutánea proporcionó exposición superior contra exposición viral intranasal secundaria. (a-b) Ratones B6 se inmunizaron con VV a través de diversas vías a una dosis de  $2 \times 10^6$  ufp. Los ratones inmunizados se expusieron letalmente a infección intranasal con WR-VV a las 6 semanas p.i.. La supervivencia (a) y el cambio de peso corporal (PC) (b) se monitorizaron diariamente después de la exposición, (c-d) ratones  
10 B6 se inmunizaron con VV a través de escarificación cutánea a las dosis indicadas, y se expusieron letalmente a infección intranasal con WR-VV a las 6 semanas p.i. La supervivencia (c) y cambio de PC (d) se monitorizaron diariamente después de la exposición. Los ratones no inmunizados se incluyeron como controles.

15 FIG. 4. La inmunización a través de escarificación cutánea con VV proporciona protección superior contra exposición a melanoma intradérmico. Ratones B6 se inmunizaron con rVV-ova a través de las vías indicadas. Los ratones inmunizados se expusieron 4 semanas después a inyección intradérmica de células de melanoma B16-ova. (a-e) Se tomaron fotografías de ratones expuestos a tumores el día 18 después del implante de las células tumorales. (f) El crecimiento tumoral se monitorizó en los ratones expuestos durante hasta 40 días.

20 FIG. 5. Se necesitó una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T para una protección superior contra exposición cutánea secundaria después de escarificación cutánea con VV. Ratones  $\mu$ MT de TS (tipo silvestre) o con déficit de linfocitos B se inmunizaron con VV a través de escarificación cutánea o inyección i.p. Después, los ratones se expusieron a través de infección cutánea secundaria a VV a las 6 semanas p.i. (a) Se determinó la carga viral en los lugares expuestos el día 6 después de la exposición. En algunos grupos de ratones de ts, los linfocitos T tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$  se agotaron antes de la exposición. (b-c) la respuesta a linfocitos T secundaria en ratones inmunizados de ts y  $\mu$ Mt expuestos se evaluó en los nódulos linfáticos inguinales de drenaje cutáneo (b) y bazo (c) el día 6 después de la exposición. (d) Se recogieron muestras cutáneas del lugar  
25 expuesto 4 días después de la exposición. Los linfocitos T  $CD3^+$  infiltrantes cutáneos se identificaron mediante inmunohistoquímica.

30 FIG. 6. Los linfocitos T, aunque no el Ac, eran importantes para la prevención de la dolencia, aunque ni los linfocitos T ni los linfocitos B eran necesarias para la supervivencia después de exposición letal intranasal con WR-VV. Ratones  $\mu$ MT de tipo silvestre (ts) o con déficit de linfocitos B se inmunizaron con VV a través de escarificación cutánea (a-b) o inyección i.p. (c-d). Después, los ratones se expusieron a infección intranasal letal con WR-VV a las 6 semanas p.i. En algunos grupos de ratones de ts, los linfocitos T tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$  se agotaron antes y durante la exposición a grandes dosis de tratamiento con Acm anti- $CD4$  y anti- $CD8$ . La supervivencia de los ratones (a, c) y el cambio de PC (b, d) se monitorizaron diariamente después de la  
35 exposición.

40 FIG. 7. La activación de linfocitos T en los NL (nódulos linfáticos) marca una expresión diferencial de retorno dirigido a la piel o al intestino en linfocitos T  $CD8^+$  al cabo de 60 h después de infección. Células OT-1 Thy1.1<sup>+</sup> marcadas con CFSE (succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína) se transfirieron de manera adoptiva en ratones B6 Thy1.2<sup>+</sup>. Después, los ratones receptores se infectaron con rVV-ova a través de escarificación cutánea o inyección i.p.. (a) 60 horas después de la infección, la proliferación de células OT-1 en NLI y NLM se  
45 mostró mediante Histogramas de células donantes Thy1.1<sup>+</sup> separados. (b-c) Los NLI de ratones infectados a través de escarificación cutánea (b) y los NLM de ratones infectados por vía i.p. (c) se analizaron a las 60 h después de infección con rVV-ova para determinar el fenotipo de retorno dirigido a células OT-1 de tejido. Se separaron gráficos de puntos de células Thy1.1<sup>+</sup>. Los números en el cuadrante indican los porcentajes en la población de células Thy1.1<sup>+</sup>. (d) La media geométrica de las intensidades de fluorescencia (GMF1) de los marcadores indicados en células OT-1 se representó gráficamente con los ciclos de división celular.

50 FIG. 8. Cinco días después de la escarificación cutánea con VV, los linfocitos T activados en NLI de drenaje cutáneo migraron a lo largo de tejidos linfoides secundarios sin virus o diseminación antigénica viral. (a) Se prepararon linfocitos a partir de los tejidos indicados 5 días después de la escarificación cutánea con rVV-ova. La proliferación de células OT-1 se analizó mediante citometría de flujo. (b) Se prepararon muestras de ARN de los tejidos indicados el día 5 después de la escarificación con VV. La infección con VV se midió mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos representan los promedios  $\pm$  d.t. de 4 experimentos independientes con tres ratones por grupo. (c) Se purificaron células presentadoras de antígeno con perlas magnéticas anti-MHC de Clase II de NLI, NLM y bazo de ratones B6 4 días después de la escarificación cutánea con rVV-ova. Las células se co-cultivaron con células OT-1 Thy1.1<sup>+</sup> marcadas con CFSE durante 60 h. La activación y proliferación de las  
55 células OT-1 se monitorizó mediante un citómetro de flujo. Los histogramas se separaron en la población de Thy1.1<sup>+</sup>.

60 FIG. 9. El día 5 después de la escarificación cutánea con rVV-ova, la molécula  $\alpha 4\beta 7$  de retorno dirigido al intestino se reguló positivamente en células  $CD8^+$  OT-1 diseminadas mediante marcadores de retorno dirigido secundario. (a) Los NLI y NLM se recogieron el día 5 después de la escarificación con rVV-ova. La expresión de los marcadores de retorno dirigido indicados en células OT-1 Thy1.1<sup>+</sup> se determinó por citometría de flujo. Las

gráficas de puntos se separaron en células Thy1.1<sup>+</sup>. (b-d) Ratones B6 que habían recibido células OT-1 Thy1.1<sup>+</sup> recibieron inyecciones diarias de FTY720 comenzando a 24 h antes de la escarificación con rVV-ova. El día 5 después de la infección, se recogieron los linfocitos de los tejidos indicados y se analizaron mediante citometría de flujo. (b) Porcentajes de células Thy1.1<sup>+</sup> en linfocitos totales. (c) Expresión de E-Lig y (d)  $\alpha 4\beta 7$  en células OT-1 en NLI. Los histogramas se separan en poblaciones de células Thy1.1<sup>+</sup>.

FIG. 10. El marcaje primario y secundario de la molécula de retorno dirigido específico de tejido durante infección viral aguda se mantuvo durante la fase de memoria. Los linfocitos se recogieron de los tejidos indicados el día 30 después de escarificación cutánea con rVV-ova. Los porcentajes de células E-Lig<sup>+</sup> o  $\alpha 4\beta 7$ <sup>+</sup> en células OT-1 Thy1.1<sup>+</sup> se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos representan el promedio  $\pm$  d.t. de 6 ratones.

FIG. 11. La inmunización con MVA a través de escarificación cutánea (e.c.) suscita una respuesta inmunitaria dependiente de la dosis. (a) Ratones B6 se inmunizaron mediante e.c. con diferentes dosis de MVA (de izquierda a derecha:  $1,8 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^6$ ,  $1,8 \times 10^5$  y  $1,8 \times 10^4$  ufp). El día 7 después de la inmunización, se observaron lesiones de viruela (pox) de una manera dependiente de la dosis. (b-c) Ratones B6 se inmunizaron con MVA o VV a través de e.c. a las dosis indicadas (ufp / ratón) (b) 7 días después de la inmunización, la respuesta de linfocitos T específica de vacuna primaria se midió en los bazos. (c) La IgG específica de la vacuna en suero se midió 6 semanas después de la inmunización. (d) Los ratones se expusieron a infección i.n. letal con WR-VV 6 semanas después de la inmunización. La supervivencia y el cambio de PC se monitorizaron diariamente.

FIG. 12. La escarificación cutánea con MVA ofrece una respuesta inmunitaria superior y una eficacia protectora en comparación con las vías de inyección. Los ratones B6 se inmunizaron con MVA a  $2 \times 10^6$  ufp a través de las vías indicadas. (a) La respuesta de linfocitos T primaria se midió el día 7 p.i. (b) La IgG específica de VV se midió a las 6 semanas p.i. (c-f) Ratones con memoria se expusieron por vía intranasal a una dosis letal de WR-VV a las 6 semanas p.i. La respuesta de linfocitos T secundaria (c) y la IgG específica de VV después de la exposición se midieron el día 6 de la exposición (d). La supervivencia (e) y el cambio de PC (f) se monitorizaron diariamente después de la exposición. Los ratones con escarificación cutánea con VV ( $2 \times 10^6$  ufp) se incluyeron como controles.

FIG. 13. La escarificación cutánea con MVA es inocua incluso para hospedadores inmunodeficientes. Ratones Rag-/- se inmunizaron con MVA o VV a  $2 \times 10^6$  ufp a través de escarificación cutánea. (a) Se tomaron fotografías de lesiones de viruela el día 7 y 28 p.i. (b) La supervivencia y (c) el cambio de PC se monitorizaron semanalmente. (d) Se determinó la carga viral recogida de ratones Rag 1-/- 3 meses después de escarificación con MVA mediante PCR en tiempo real. Como controles se utilizó piel sin tratar y piel de ratones de ts con escarificación con VV el día 7

### Descripción detallada

Los aspectos de la invención se basan, en parte, en el descubrimiento de que puede conseguirse una respuesta inmunitaria fuerte y duradera contra un antígeno mediante la administración de un poxvirus modificado, con replicación deficiente o no replicante, que contiene el antígeno, a una epidermis mecánicamente alterada de un sujeto.

### Procedimientos de tratamiento

En el presente documento se desvelan procedimientos novedosos para estimular una respuesta inmunitaria y/o inmunizar a un sujeto contra una infección (o una enfermedad infecciosa) o un cáncer. Los procedimientos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite un vector poxviral modificado, con replicación deficiente o no replicante, que contiene antígenos en una cantidad suficiente para estimular la respuesta inmunitaria contra el antígeno, administrándose el poxvirus a una epidermis mecánicamente alterada del sujeto.

Un sujeto significará un ser humano o un animal vertebrado, incluyendo, pero sin limitación, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, cabra, oveja, pavo, pollo, primate (por ejemplo, mono o chimpancé), roedor (por ejemplo, ratón, rata o hámster) y peces. Preferentemente el sujeto es un mamífero y más preferentemente es un ser humano.

Los procedimientos desvelados en el presente documento son útiles para estimular una respuesta inmunitaria y/o inmunizar a un sujeto que necesite dicho tratamiento. Un sujeto que necesite dicho tratamiento es un sujeto que tiene o corre el riesgo de tener cáncer o un sujeto que tiene o corre el riesgo de tener una infección (por ejemplo un sujeto que tiene o que corre el riesgo de contraer una infección viral, bacteriana, fúngica o protozoaria).

Un sujeto que tiene cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. "Cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento incontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales.

Un sujeto que corre el riesgo de desarrollar un cáncer es un sujeto que tiene una probabilidad mayor de lo normal de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer. Estos sujetos también incluyen sujetos expuestos a agentes causantes de cáncer (es decir, carcinógenos) tales como tabaco,

amianto u otras toxinas químicas, o sujetos que previamente se han tratado contra el cáncer y que tienen una remisión aparente.

5 Un sujeto que tiene una infección es un sujeto que se ha expuesto a un microorganismo infeccioso y que tiene niveles detectables agudos o crónicos del microorganismo en su organismo o que tiene signos y síntomas del microorganismo infeccioso. Los procedimientos para evaluar y detectar infecciones en un sujeto son conocidos por los expertos habituales en la técnica.

10 Un sujeto que corre el riesgo de tener una infección es un sujeto que se espera que se ponga en contacto con un microorganismo infeccioso. Los ejemplos de dichos sujetos son personal sanitario o personas que viajan a lugares del mundo donde la frecuencia de infección es elevada. En algunas realizaciones, el sujeto corre un riesgo elevado de tener una infección debido a que el sujeto tiene uno o más factores de riesgo para tener una infección. Los ejemplos de factores de riesgo para tener una infección incluyen, por ejemplo, inmunosupresión, inmunocompromiso, edad, traumatismo, quemaduras (por ejemplo, quemaduras térmicas), cirugía, cuerpos extraños, cáncer, recién nacidos, especialmente recién nacidos prematuros. El grado de riesgo de una infección depende de la multitud y de la gravedad o de la magnitud de los factores de riesgo que tiene el sujeto. Se dispone de cuadros de riesgo y de algoritmos de predicción para evaluar el riesgo de una infección en un sujeto basándose en la presencia y en la gravedad de los factores de riesgo. Otros procedimientos para evaluar el riesgo de una infección en un sujeto son conocidos por los expertos habituales en la técnica. El sujeto que tiene un riesgo elevado de infección puede ser un sujeto aparentemente sano. Un sujeto aparentemente sano es un sujeto que no tiene signos o síntomas de enfermedad.

## 20 Vectores virales

Los poxvirus son vectores útiles para una serie de usos, por ejemplo vacunas para generar respuestas inmunitarias, para el desarrollo de nuevas vacunas, para administrar proteínas deseadas y para terapia génica. Las ventajas de estos vectores poxvirales incluyen: (i) la facilidad de generación y producción, (ii) el gran tamaño del genoma que permite la inserción de genes múltiples (es decir, como un vector multivalente), (iii) el suministro eficaz de genes a múltiples tipos de células, incluyendo células presentadoras de antígeno, (iv) los altos niveles de expresión de proteínas, (v) la presentación óptima de antígenos al sistema inmunitario y (vi) la capacidad de suscitar respuestas inmunitarias mediadas por células así como respuestas de anticuerpos, (vii) capacidad de usar combinaciones de poxvirus de diferentes géneros, ya que no reaccionan inmunológicamente en cruzado y (viii) la experiencia prolongada adquirida con el uso de estos vectores en seres humanos como una vacuna de la viruela.

30 Los poxvirus pueden modificarse por ingeniería genética para que contengan y expresen ADN exógeno, interfiriendo o no con la capacidad del virus para replicarse. Dicho ADN exógeno puede codificar una gran diversidad de proteínas, tales como antígenos que inducen protección contra uno o más agentes infecciosos, proteínas inmunomoduladoras tales como moléculas co-estimuladoras o proteínas enzimáticas. Por ejemplo, se han modificado por ingeniería genética virus de vacunas recombinantes para expresar antígenos inmunizantes de herpesvirus, virus de la hepatitis B, de la rabia, gripales, de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros virus (Kieny y col., Nature 312: 163-6 (1984); Smith y col., Nature 302: 490-5 (1983); Smith y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7155-9 (1983); Zagury y col., Nature 326: 249-50 (1987); Cooney y col., Lancet 337: 567-72 (1991); Graham y col., J. Infect. Dis. 166: 244-52 (1992), y se ha demostrado que suscitan respuestas inmunitarias contra el virus gripal, virus del dengue, virus sincitial respiratorio y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los poxvirus también se han utilizado para generar reacciones inmunitarias contra antígenos asociados a tumores tales como el ACE (antígeno carcinoembrionario), APE (Antígeno Prostático Específico) y MUC.

45 Los poxvirus son virus citoplasmáticos muy conocidos. El material genético expresado por dichos vectores virales permanece típicamente en el citoplasma y no tienen la posibilidad de una integración involuntaria del material genético en los genes de las células huésped, a menos que se realicen etapas específicas. Como resultado de la naturaleza citoplasmática no integrativa de los poxvirus, el sistema de vector poxviral no dará como resultado que tenga una persistencia duradera en otras células. Por tanto, el vector y las células transformadas no afectarán adversamente a las células en el animal huésped en lugares distantes de la célula diana.

50 Comparados con otros sistemas, tales como los vectores retrovirales (incluyendo vectores lentivirales), los vectores adenovirales y los vectores de virus adenoasociados, el gran genoma de los poxvirus permite insertar grandes genes en los vectores basados en poxvirus. Ventajosamente, debido a la naturaleza citoplasmática de los poxvirus, no se producirá la integración de ADN exógeno en un genoma de una célula huésped.

55 Se han desarrollado diversos poxvirus como vectores virales vivos para la expresión de proteínas heterólogas, por ejemplo, la cepa Ankara de la vacuna modificada (MVA) del virus de la vacuna atenuado y la cepa Wyeth (Cepko y col., Cell 37: 1053 1062 (1984); Morin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4626 4630 (1987); Lowe y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3896 3900 (1987); Panicali y Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927 4931 (1982); Mackett y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 7415 7419 (1982)). Otras cepas del virus de la vacuna atenuado incluyen la cepa WR, la cepa NYCBH, ACAM2000, la cepa Lister, LC16m8, Elstree-BNm, la cepa de Copenhagen y la cepa de Tiantan.



El virus de la vacuna es el prototipo del género *Orthopoxvirus*. Se trata de un ADN bicatenario (ácido desoxirribonucleico) que tiene una gran variedad de huéspedes en condiciones experimentales (Fenner y col. *Orthopoxviruses*. San Diego, Calif.: Academic Press, Inc., 1989; Damaso y col., *Virology* 277: 439-49 (2000)).

5 El virus de la vacuna Ankara modificado (MVA) o sus derivados se han generado mediante pases prolongados en serie de la cepa Ankara del virus de la vacuna (CVA) en fibroblastos de embrión de pollo (para una revisión véase  
 10 Mayr, A., y col., *Infection*, 3: 6-14 (1975). El propio virus MVA puede obtenerse a partir de diversas fuentes públicas depositarias. Por ejemplo, el MVA se depositó conforme a los requisitos del Tratado de Budapest en la CNCM (Instituto Pasteur, Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25, calle del Doctor Roux, 75724 París Código Postal 15) el 15 de dic de 1987 con el N° de Depósito I-721 (Pat. de Estados Unidos N° 5.185.146); el virus  
 15 MVA se depositó conforme al Tratado de Budapest en la Colección Europea de Cultivos de Células (ECACC) (CAMR, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, RU) el 27 de ene de 1994, con el N° de Depósito V94012707) (Pat. De Estados Unidos N° 6.440.422 y el número de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0013190). Además, la publicación de patente de Estados Unidos número 2003/0013190 también desvela cepas de MVA particulares depositadas en la ECACC con el N° de depósito 99101431 y en la ECACC con el número de acceso provisional 01021411. Son vectores disponibles en el comercio THERION-MVA, THERION PRIFREE y los vectores THERION de la serie M (Therion Biologics Corporation, MA).

20 El MVA se generó mediante 516 pases en serie en fibroblastos de embrión de pollo de la cepa Ankara del virus de la vacuna (CVA) (para una revisión véase Mayr, A., y col. *Infection* 3, 6-14 [1975]). Como consecuencia de estos pases prolongados, se deleccionaron aproximadamente 31 kilobases de la secuencia genómica del virus (delección I, II, III, IV, V y VI) y, por lo tanto, el virus MVA resultante se describió como que estaba muy limitado a células  
 25 hospedadoras de células de ave (Meyer, H. y col., *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 [1991]). Se demostró, en una variedad de modelos animales, que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. y Danner, K. [1978] *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34). Adicionalmente esta cepa de MVA se había ensayado en estudios clínicos como una vacuna para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana (Mayr y col., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B* 167, 375-390 [1987], Stickl y col., *Dtsch. med. Wschr.* 99, 2386-2392 [1974]). En estos estudios participaron más de 120.000 seres humanos, incluyendo pacientes de alto riesgo y se demostró que en comparación con las vacunas basadas en vaccinia, el MVA tenía una virulencia o infecciosidad disminuida mientras que inducía una buena  
 30 respuesta inmunitaria. Generalmente, una cepa de un virus se considera como atenuada si ha perdido su capacidad, o solamente tiene capacidad reducida, para replicarse reproductivamente en células huésped.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión poxvirus “no replicante” o con “replicación defectuosa” se refiere a un poxvirus que no es capaz de replicarse a ningún grado significativo en la mayoría de las células normales de mamífero o en células humanas primarias normales. Como se usa en el presente documento “grado significativo” significa una capacidad de replicación del 75 % o menor en comparación con el virus de la vacuna de tipo silvestre en ensayos estándar. En algunas realizaciones, el poxvirus tiene una capacidad de replicación del 65 %, 55 %, 45 %, 35 %, 25 % o 15 % en comparación con el virus de la vacuna de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el poxvirus tiene una capacidad de replicación del 5 % o menor, o del 1 % o menor en comparación con el virus de la vacuna de tipo silvestre. Los virus no replicantes tienen una replicación deficiente del 100 % en células humanas primarias normales.

40 En la técnica se conocen ensayos de replicación viral y pueden realizarse para virus de vacuna por ejemplo en queratinocitos primarios y se describen, por ejemplo, en Liu y col. *J. Virol.* 2005, 79: 12, 7363-70. Los virus que son no replicantes o con replicación defectuosa pueden haberse convertido así de manera natural (es decir pueden aislarse como tales de la naturaleza) o artificial, por ejemplo, por reproducción *in vitro* o mediante manipulación genética, por ejemplo, delección de un gen que es crítico para la replicación. Será generalmente uno o algunos tipos de células en los que el virus pueda desarrollarse, tales como células de FEP (fibroblastos de embrión de pollo) para el MVA.  
 45

50 Como se usa en el presente documento un poxvirus “modificado” se refiere a un poxvirus que se ha alterado de alguna manera que cambia una o más características del virus modificado en comparación con el virus de tipo silvestre. Estos cambios pueden producirse naturalmente o a través de modificación por ingeniería genética. En algunas realizaciones, el poxvirus modificado se altera para incluir uno o más antígenos, que son inmunogénicos (es decir inducen una respuesta inmunitaria en un huésped). Los antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos cancerosos o antígenos microbianos.

55 En algunas realizaciones, los cambios en el poxvirus incluyen, por ejemplo, alteraciones en el perfil de expresión génica del virus. Los poxvirus modificados expresan genes o partes de genes que codifican péptidos o polipéptidos que son exógenos al poxvirus, es decir no se encontrarían en un poxvirus de tipo silvestre. Estos péptidos o polipéptidos exógenos o heterólogos pueden comprender secuencias que son inmunogénicas tales como, por ejemplo, antígenos específicos de tumor (AET), antígenos bacterianos, virales, fúngicos y protozoarios, o secuencias antigénicas procedentes de virus distintos de poxvirus. En algunas realizaciones, los poxvirus modificados descritos en el presente documento pueden expresar polipéptidos no poxvirales que comprenden antígenos y están adicionalmente atenuados, es decir tienen menos capacidad de propagarse debido a modificaciones que afectan a  
 60 la tasa de replicación viral, de tal manera que estos poxvirus modificados tiene una replicación deficiente o son no replicantes.

Una de las ventajas de los poxvirus como vectores es el gran tamaño de sus genomas, lo que permite la inserción de una amplia serie de material genético que incluye genes múltiples (es decir, como un vector multivalente). El material genético puede insertarse en un lugar apropiado dentro del genoma del poxvirus para que el virus recombinante siga siendo viable, es decir, el material genético puede insertarse en un lugar en el ADN viral (por ejemplo, un lugar no esencial en el ADN viral) para garantizar que el virus recombinante mantiene la capacidad de infectar células exógenas y expresar ADN, manteniendo al mismo tiempo la inmunogenicidad deseada y la virulencia disminuida. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, el MVA contiene 6 sitios de delección naturales, que se ha demostrado que sirven como sitios de inserción. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.185.146, y 6.440.422. Los poxvirus descritos en el presente documento con frecuencia se denominan vector viral o sistema de vector viral.

En algunas realizaciones, los genes que codifican antígenos deseados se insertan en el genoma de un poxvirus de tal manera que los permita expresar por ese virus junto con la expresión del complemento normal de las proteínas parentales del virus. Esto puede realizarse construyendo en primer lugar un vector donante de ADN para recombinación *in vivo* con un poxvirus.

En general, el vector donante de ADN contiene los siguientes elementos: (i) un origen de replicación procariota, de tal manera que el vector puede amplificarse en un huésped procariota; (ii) un gen que codifica un marcador que permite la selección de células huésped procariotas que contienen el vector (por ejemplo, un gen que codifica resistencia a antibióticos); (iii) al menos un gen que codifica una proteína deseada localizada adyacente a un promotor transcripcional capaz de dirigir la expresión del gen; y (iv) secuencias de ADN homólogas a la región del genoma del virus parental en la que el gen (o genes) exógeno se insertará, flanqueando la construcción del elemento (iii).

En el documento WO91/19803 se describen, por ejemplo, procedimientos para construir plásmidos donantes para la introducción de genes exógenos múltiples en poxvirus. En general, todos los fragmentos de ADN para la construcción del vector donante, incluyendo fragmentos que contienen promotores transcripcionales y fragmentos que contienen secuencias homólogas a la región del genoma del virus parental en el que van a insertarse los genes exógenos, puede obtenerse a partir de ADN genómico o fragmentos de ADN clonados. Los plásmidos donantes pueden ser mono-, di-, o multivalentes (es decir, pueden contener una o más secuencias génicas exógenas insertadas).

El vector donante puede contener un gen adicional que codifica un marcador que permite la identificación de virus recombinantes que contengan el ADN exógeno insertado. Para permitir la identificación y el aislamiento de virus recombinantes pueden usarse diversos tipos de genes marcadores. Estos incluyen, por ejemplo, genes que codifican resistencia a antibióticos o a productos químicos (véase, por ejemplo, Spyropoulos y col., *J. Virol.*, 62: 1046 (1988); Falkner y Moss., *J. Virol.*, 62: 1849 (1988); Franke y col., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1918 (1985), así como genes tales como el gen *lacZ* de *E. coli*, que permite la identificación de placas virales recombinantes mediante un ensayo colorimétrico (Panicali y col., *Gene*, 47: 193 199 (1986)).

La recombinación homóloga entre ADN plasmídico donante y ADN viral en una célula infectada da como resultado la formación de virus recombinantes que incorporan los elementos deseados. Las células huésped apropiadas para la recombinación *in vivo* son generalmente células eucariotas que pueden infectarse por el virus y transfectarse mediante el vector plasmídico. Los ejemplos de dichas células adecuados para su uso con poxvirus son las células dérmicas de embrión de pollo (DEP), células HuTK143 (humanas) y CV-1 y BSC-40 (ambas de riñón de mono). La infección de células con poxvirus y la transfección de estas células con vectores plasmídicos se realizan por técnicas convencionales en la materia (Panicali y Paoletti, Patente de Estados Unidos N° 4.603.112, documento WO89/03429). Como alternativa, el ADN donante puede ligarse directamente en el genoma del virus parental en un único sitio de restricción (Scheiflinger, y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 9977 9981).

Después de la recombinación o ligamiento *in vivo*, la progenie viral recombinante puede identificarse mediante diversas técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, si el vector donante de ADN se diseña para insertar genes exógenos en el gen de timidina quinasa (TK) del virus parental, los virus que contienen el ADN integrado serán TK<sup>-</sup> y pueden seleccionarse en esta base (Mackett y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7415 (1982)). Como alternativa, la co-integración de un gen que codifica un marcador o de un gen indicador con el gen (o genes) exógeno de interés, como se describe anteriormente, puede usarse para identificar progenie recombinante. Un gen indicador preferido es el gen *lacZ* de *E. coli*: virus recombinantes que expresan β-galactosidasa pueden seleccionarse usando un sustrato cromogénico para la enzima (Panicali y col., *Gene*, 47: 193 (1986)).

Una vez identificado un virus recombinante, pueden usarse diversos procedimientos bien conocidos en la técnica para ensayar la expresión del polipéptido codificado por el gen insertado. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, ensayos en placa negra (un inmunoensayo enzimático *in situ* realizado en placas virales), análisis de transferencia de Western, radioinmunoprecipitación (RIPA), inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayos funcionales, tal como el ensayo con LCT (linfocitos T citotóxicos).

Dado que los poxvirus tienen un gran genoma, estos pueden usarse fácilmente para administrar una amplia variedad de material genético incluyendo genes múltiples (es decir actúan como un vector multivalente). Los tamaños de los

genomas poxvirales varían entre aproximadamente 130-300 kpb con hasta 300 genes, dependiendo de la cepa de los virus. Por lo tanto, es posible insertar grandes fragmentos de ADN exógeno en estos virus y continuar manteniendo la estabilidad del genoma viral.

Antígenos y moléculas inmunoestimuladoras expresados por vectores virales

5 Al menos un fragmento de ácido nucleico que codifica un gen se inserte en un vector poxviral. En otra realización al menos dos y hasta aproximadamente diez diferentes ácidos nucleicos que codifican diferentes genes se insertan en el vector poxviral.

10 En algunas realizaciones, el poxvirus tiene insertado un ADN que codifica un antígeno de interés relacionado con enfermedades, tales como uno o más antígenos de un agente causante de enfermedad o un antígeno asociado con una patología, y que expresa ese antígeno (o antígenos).

En determinadas realizaciones, el poxvirus tiene insertado el ADN que codifica una o más moléculas co-estimuladoras y que expresa la molécula (o moléculas) coestimuladora.

15 En determinadas realizaciones, el poxvirus tiene insertado el ADN que codifica un antígeno (o antígenos) de interés relacionado con enfermedad y una molécula (o moléculas) coestimuladora y expresa el antígeno (o antígenos) y la molécula (o moléculas) coestimuladora.

Cualquier ADN de interés puede insertarse en el vector poxviral descrito en el presente documento. Los genes exógenos para la inserción en el genoma de un poxvirus en forma expresable pueden obtenerse mediante cualquier técnica convencional para aislar un gen deseado.

20 Para organismos que contienen un genoma de ADN, los genes que codifican un antígeno de interés pueden aislarse del ADN genómico; por organismos con genomas de ARN, el gen deseado puede aislarse de copias de ADNc del genoma. Si se dispone de mapas de restricción del genoma, pueden diseñarse estrategias para escindir el ADN genómico mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir fragmentos de ADN que contengan el gen de interés. En algunos casos, los genes deseados pueden haberse clonado previamente y por tanto, los genes pueden obtenerse a partir de clones disponibles. Como alternativa, si se conoce la secuencia de ADN del gen, el gen puede sintetizarse mediante cualquiera de las técnicas convencionales por reacción en cadena de la polimerasa o síntesis de ácidos desoxirribonucleicos (por ejemplo, las técnicas de fosfato o de fosfito triéster).

Modificación genética de los vectores virales para expresar antígenos

30 Los genes que codifican un antígeno de interés pueden amplificarse clonando el gen en un huésped bacteriano. Para esta finalidad, pueden usarse diversos vectores de clonación procariotas. Son ejemplos los plásmidos pBR322 y pEMBL.

35 Los genes que codifican el antígeno de interés pueden prepararse por inserción en los vectores poxvirales mediante técnicas convencionales. En general, los genes clonados pueden escindirse del vector de clonación procariota mediante digestión con enzimas de restricción. El fragmento de ADN portador del gen clonado puede modificarse según sea necesario, por ejemplo, para hacer que los extremos del fragmento sean compatibles con los sitios de inserción de los vectores poxvirales, y después purificarse antes de la inserción en estos vectores en sitios de escisión con endonucleasas de restricción (sitios de clonación). Las técnicas básicas de la inserción de genes en virus son conocidas por el experto en la técnica e implican, por ejemplo, la recombinación entre las secuencias de ADN viral que flanquean un gen en un plásmido donante y secuencias homólogas presentes en el virus parental (Mackett, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7415-7419 (1982)).

40 Por ejemplo, la secuencia génica de ADN a insertar en el virus puede colocarse en un plásmido, por ejemplo, una construcción plasmídica de *E. coli*, en la que el ADN es homólogo a una sección de ADN de tal manera que el poxvirus se ha insertado. Independientemente, la secuencia génica de ADN a insertar se liga a un promotor. El ligamiento del gen con el promotor se posiciona en la construcción plasmídica de manera que el ligamiento del gen con el promotor se flanquea en ambos extremos con ADN homólogo con respecto a una secuencia de ADN  
45 flanqueante de una región del ADN poxviral que es la región de inserción deseada. La construcción plasmídica resultante se amplifica después por crecimiento dentro de bacterias *E. coli* y se aísla. Preferentemente, el plásmido también contiene un origen de replicación tal como el origen de replicación de *E. coli* y un marcador tal como un gen de resistencia a antibióticos para la selección y propagación en *E. coli*. El plásmido aislado que contiene la secuencia génica de ADN a insertar, se transfecta en un cultivo celular, por ejemplo, en fibroblastos de embrión de pollo, junto con el poxvirus. La recombinación entre el ADN poxviral homólogo en el plásmido y el genoma viral da  
50 como resultado respectivamente un poxvirus modificado por la presencia de la construcción promotor-gen en su genoma, en un sitio que no afecta a la viabilidad del virus.

En determinadas realizaciones se realiza la inserción de más de un ácido nucleico, por ejemplo uno o más antígenos y una o más moléculas co-estimuladoras.

55

En algunas realizaciones, el gen (o genes) puede insertarse en un sitio o región (región de inserción) en el poxvirus que no afecta principalmente la viabilidad del virus recombinante resultante, por ejemplo, regiones intragénicas entre genes virales, preferentemente genes virales no esenciales. El experto en la técnica puede identificar fácilmente dichas regiones en un virus, por ejemplo, mediante un ensayo de segmentos de ADN de virus para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar gravemente a la viabilidad del virus recombinante. Una región que puede usarse fácilmente y que está presente en muchos virus, por ejemplo, es el gen de la timidina quinasa que se ha descubierto en todos los genomas de poxvirus examinados (leporipoxvirus: Upton, y col., J. Virology, 60: 920 (1986) (virus del fibroma de Shope); capripoxvirus: Gershon, y col., J. Gen. Virol., 70: 525 (1989) (Kenya sheep-1); orthopoxvirus: Weir, y col., J. Virol., 46: 530 (1983) (vaccinia); Esposito, y col., Virology, 135: 561 (1984) (virus de la monkeypox y de la viruela); Hruby, y col., PNAS, 80: 3411 (1983) (vaccinia); Kilpatrick, y col., Virology, 143: 399 (1985) (virus tumoral de mono de Yaba); avipoxvirus: Binns, y col., J. Gen. Virol. 69: 1275 (1988) (viruela aviar); Boyle, y col., Virology, 156: 355 (1987) (viruela aviar); Schnitzlein, y col., J. Virological Methods, 20: 341 (1988) (viruela aviar, viruela de la codorniz); entomopox (Lytvyn, y col., J. Gen. Virol. 73: 3235-3240 (1992)). En la viruela aviar, además de la región TK, otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, BamHI.J (Jenkins, y col., AIDS Research and Human-Retroviruses 7: 991-998 (1991)) el fragmento EcoRI-HindIII, el fragmento BamHI, el fragmento EcoRV-HindHIII, el fragmento BamHI y el fragmento HindIII expuesto en la Solicitud EPO N° 0 308 220 A1. (Calvert, y col., J. of Virol. 67: 3069-3076 (1993); Taylor, y col., Vaccine 6: 497-503 (1988); Spohner, y col., (1990) y Bournnell, y col., J. of Gen. Virol. 71: 621-628 (1990)).

En algunas realizaciones, los poxvirus descritos en el presente documento pueden incorporar opcionalmente en su genoma uno o más genes o partes de los mismos que codifican una o más moléculas inmunoestimuladoras o genes o partes de los mismos.

En determinadas realizaciones el ADN exógeno no codifica una proteína completa sino que codifica fragmentos antigénicos de proteínas o epítomos. Estos fragmentos pueden tener cualquier longitud suficiente para ser inmunogénicos o antigénicos. Los fragmentos pueden tener al menos 4 aminoácidos de longitud, preferentemente 5-9 aminoácidos, pero pueden ser más largos, tales como, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500 aminoácidos de longitud o más o cualquiera longitud entre ellos. Preferentemente, los epítomos que inducen una respuesta inmunoprotectora contra cualquiera de una diversidad de patógenos, tales como bacterias, virus, hongos y protozoos tales como los descritos en el presente documento, pueden expresarse y pueden combinarse con secuencias génicas heterólogas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras, tales como citocinas, interferón de tipo 1, gamma interferón, factores estimuladores de colonias, interleucina-1, -2, -4, -5, -6, -12.

En algunas realizaciones, las secuencias heterólogas pueden proceder de antígenos tumorales, y los poxvirus recombinantes resultantes pueden usarse para generar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que conducen a regresión tumoral *in vivo*. Los virus recombinantes pueden modificarse genéticamente para expresar un antígeno asociado a tumor (AAT), un antígeno específico de tumor (AET) o un antígeno específico de tejido.

En algunas realizaciones, el gen (o genes) insertado que codifica antígenos puede estar unido operativamente a un promotor para expresar el gen insertado. Los promotores son muy conocidos en la técnica y pueden seleccionarse fácilmente dependiendo del huésped y del tipo de célula que se desea como objetivo. Por ejemplo en poxvirus, pueden usarse promotores poxvirales tales como la vacuna de 7,5K, 40K, virus aviar. En determinadas realizaciones, también pueden usarse elementos potenciadores en combinación para aumentar el nivel de expresión. En determinadas realizaciones, pueden usarse promotores inducibles que son muy conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los promotores poxvirales incluyen, por ejemplo, un promotor de entomopoxvirus, un promotor de avipoxvirus, o un promotor de orthopoxvirus, tal como un promotor de vacuna, por ejemplo HH, 11K o Pi. Por ejemplo, el promotor Pi, de la región Ava I H de la vacuna, se describe en Wachsmann y col., J. of Inf. Dis. 155, 1188-1197 (1987). Más particularmente, este promotor procede del fragmento Ava I H (Xho I G) de la cepa de la vacuna WR variante L, en la que el promotor dirige la transcripción de derecha a izquierda. La localización del promotor en el mapa es de aproximadamente 1,3 Kpb (kilopares de bases) desde el extremo 5' de Ava IH, aproximadamente 12,5 Kpb desde el extremo 5' del genoma de la vacuna, y aproximadamente 8,5 Kpb 5' de la unión Hind III C/N. La secuencia promotora H de Hind III (también "HH" y "H6" en el presente documento) es una fase de lectura abierta H6 cadena arriba por Rosel y col., J. Virol. 60, 436-449 (1986). El promotor 11K es como describen Wittek, J. Virol. 49, 371-378 (1984) y Bertholet, C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096-2100 (1985). Se puede aprovechar si el promotor es un promotor tardío o temprano con respecto a la expresión en el tiempo de genes particulares.

En algunas realizaciones, el vector poxviral comprende un promotor que está modulado por un factor o indicio externo, que permite controlar el nivel del polipéptido a producir por los vectores activando ese factor o indicio externo. Por ejemplo, las proteínas de choque térmico son proteínas codificadas por genes en las que el promotor está regulado por la temperatura. El promotor del gen que codifica la proteína metalotionina que contiene metal es sensible a iones Cd<sup>2+</sup>. La incorporación de este promotor u otro promotor, influenciada por indicios externos también posibilita el regular la producción de los polipéptidos que comprenden el antígeno.

En algunas realizaciones, el genoma poxviral se modifica para llevar un ácido nucleico que codifique al menos un gen de interés que codifique, por ejemplo un antígeno, que está unido operativamente a un promotor "inducible". Dichos sistemas inducibles permiten regular cuidadosamente la expresión génica. Véase, Miller y Whelan, *Human Gene Therapy*, 8: 803-815 (1997). La frase "promotor inducible" o "sistema inducible" como se usa en el presente documento incluye sistemas en los que la actividad promotora puede regularse usando un agente suministrado externamente. Dichos sistemas incluyen, por ejemplo, sistemas que usan el represor lac de *E. coli* como un modulador de la transcripción para regular la transcripción de los promotores de células de mamífero portadores del operador lac (Brown y col. *Cell*, 49: 603-612, 1987); sistemas que usan el represor de tetraciclina (tetR) (Gossen y Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551, 1992; Yao y col., *Human Gene Ther.* 9: 1939-1950, 1998; Shokell y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6522-6526, 1995). Otros sistemas de este tipo incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 usando castradiol, RU486/mifepristona, difenol muristerona o rapamicina (véase, Miller y Whelan, citados anteriormente, en la FIG. 2). Otro ejemplo más es un sistema inducible por ecdisona (véase, por ejemplo Karns y col, *MBC Biotechnology* 1: 11, 2001). Los sistemas inducibles se encuentran disponibles, por ejemplo, en Invitrogen, Clontech y Ariad. Se prefieren los sistemas que utilizan un represor con el operón. Estos promotores pueden adaptarse sustituyendo partes de promotores pox por el promotor de mamíferos.

En algunas realizaciones, se introduce un "elemento regulador transcripcional" o "ERT" para la regulación del gen de interés. Como se usa en el presente documento, un ERT es una secuencia de polinucleótidos, preferentemente una secuencia de ADN, que regula (es decir, controla) la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente mediante una ARN polimerasa para formar ARN. Como se usa en el presente documento, un ERT aumenta la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente en una célula huésped que permite que funcione el ERT. El ERT comprende un elemento potenciador y/o un elemento promotor de pox, que puede o no proceder del mismo gen. Los componentes promotores y potenciadores de un ERT pueden estar en cualquier orientación y/o distancia de la secuencia codificante de interés, y comprenden multímeros de la anterior, siempre que se obtenga la actividad transcripcional deseada.

En algunas realizaciones, se proporciona un "potenciador" para la regulación del gen de interés. Un potenciador es un término bien entendido en la técnica y es una secuencia de polinucleótidos procedente de un gen que aumenta la transcripción de un gen que está unido operativamente a un promotor a un nivel que es mayor que el de la activación de la transcripción efectuada por el propio promotor cuando está unido operativamente al gen, es decir aumenta la transcripción del promotor.

La actividad de un elemento regulador tal como un ERT o un potenciador generalmente depende de la presencia de factores reguladores transcripcionales y/o de la ausencia de inhibidores reguladores transcripcionales. La activación transcripcional puede medirse de diversas maneras conocidas en la técnica, pero generalmente se mide por detección y/o cuantificación del ARNm o del producto de proteína de la secuencia codificante bajo del control (es decir unido operativamente a) del elemento regulador. El elemento regulador puede tener diversas longitudes, y diversa composición de secuencia. Por activación transcripcional, se entiende que la transcripción aumentará por encima de los niveles basales en la célula diana en al menos aproximadamente 2 veces, preferentemente al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 20 veces. Más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 100 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 200 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente de 400 a aproximadamente 500 veces, incluso más preferentemente, al menos aproximadamente 1000 veces. Los niveles basales son generalmente los niveles de actividad, si hubiera, en una célula no diana, o el nivel de actividad (si hubiera) de una construcción indicadora que carece del ERT o potenciador de interés como se ensaya en un tipo de célula diana.

Se ha demostrado que determinadas mutaciones puntuales dentro de secuencias de los ERT disminuyen la unión de los factores de transcripción y la activación génica. Un experto en la técnica reconocerá que algunas alteraciones de bases en y sobre sitios de unión con factores de transcripción conocidos afectan más probablemente de manera negativa a la activación génica y a la especificidad celular, mientras que alteraciones en las bases que no están implicadas en la unión de los factores de transcripción probablemente no tienen dichos efectos. Determinadas mutaciones también pueden aumentar la actividad del ERT. El ensayo de los efectos de la alteración de bases puede realizarse *in vitro* o *in vivo* mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como ensayos de cambio de movilidad, o vectores de transcripción que contienen estas alteraciones en células funcionales y no funcionales de ERT. Adicionalmente, un experto en la técnica reconocerá que pueden realizarse mutaciones y delecciones puntuales en una secuencia ERT sin alterar la capacidad de la secuencia para regular la transcripción.

#### Trastornos a tratar o a prevenir mediante vacunación con vectores virales

Como se describe en el presente documento, los vectores poxvirales proporcionados en el presente documento codifican fragmentos antigénicos o inmunogénicos (antígenos). El antígeno de interés puede ser un antígeno de un microorganismo patógeno o un antígeno tumoral (o cáncer). Los genes o fragmentos de ácido nucleico que codifican el antígeno pueden proceder de cualquier organismo, incluyendo bacterias, virus, hongos, protozoos, parásitos, células normales o transformadas, u otros microorganismos.

En algunas realizaciones, los genes de interés son aquellos que codifican proteínas inmunogénicas de un organismo patógeno. En determinadas realizaciones, estos pueden ser componentes proteicos de estructuras superficiales tales como la pared celular bacteriana o la envoltura viral.

### Cánceres

- 5 En algunas realizaciones, los genes de interés son aquellos que codifican antígenos asociados a tumor (AAT), antígenos específicos de tumor (AET), antígenos específicos de tejido, antígenos tumorales virales, proteínas oncogénicas celulares, y/o antígenos de diferenciación asociados a tumor.

10 En algunas realizaciones, pueden usarse fragmentos inmunogénicos o subunidades de las proteínas. Pueden usarse fragmentos múltiples o subunidades de diversas proteínas. Por ejemplo, pueden expresarse varios epítopos diferentes de diferentes sitios de una sola proteína o de diferentes proteínas de la misma especie, o de una proteína ortóloga de diferentes especies.

15 La estrategia inmunoterapéutica para el tratamiento del cáncer se basa en la observación de que las células tumorales humanas expresan una diversidad de antígenos asociados a tumor (AAT) o antígenos específicos de tumor (AET) que típicamente no se expresan en tejidos normales. Estos antígenos pueden servir como dianas para el sistema inmunitario del hospedador y para suscitar respuestas que dan como resultado la destrucción tumoral. Esta respuesta inmunitaria está mediada principalmente por linfocitos; linfocitos T en general y linfocitos T citotóxicos limitados al MHC de clase I que en particular desempeñan una función principal en el rechazo tumoral. Hellstrom, K. E., y col., (1969) *Adv. Cancer Res.* 12: 167-223; Greenberg, P. D. (1991) en *Advances in Immunology*, vol. 49 (Dixon, D. J., ed.), págs. 281-355, Academic Press, Inc., Orlando, FL. La clonación de los AAT para inmunoterapia del cáncer se describe, por ejemplo, en Boon, T., y col., (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12: 337-365; Brithcard, V., y col., (1993) *J. Exp. Med.* 178: 489-495; Cox, A. L., y col., (1994) *Science* 264: 716-719; Houghton, A. N. (1994) *J. Exp. Med.* 180: 1-4; Pardoll, D. M. (1994) *Nature* 369: 357-358; Kawakami, Y., y col., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3515-3519; Kawakami, Y., y col., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6458-6462.

25 El uso de virus de la vacuna para inmunoterapia antitumoral se ha descrito, por ejemplo, en Hu, S. L., Hellstrom, I., y Hellstrom K. E. (1992) en *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems* (R. W. Ellis, ed) págs. 327-343, Butterworth-Heinemann, Boston. Se han suscitado respuestas antitumorales usando poxvirus recombinantes que expresan AAT tales como el antígeno carcinoembrionario (ACE) y el antígeno específico de próstata (AEP). (Muraro, R., y col., (1985) *Cancer Res.* 45: 5769-5780); (Kantor, 3., y col. (1992) *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1084-1091); (Robbins, P. F., y col. (1991) *Cancer Res.* 51: 3657-3662) (Kantor, 3., y col. (1992) *Cancer Res.* 52: 6917-6925). Con estos vectores no se observó toxicidad.

30 En general, se piensa que las vacunas virales actúan como mediadores del rechazo tumoral activando linfocitos T limitados al MHC de clase I, particularmente linfocitos T citotóxicos (LTC). La activación de linfocitos T a menudo se potencia proporcionando un inmunomodulador adecuado, por ejemplo un factor coestimulador de linfocitos T tales como los de la familia del gen B7. Véase, por ejemplo, Greenberg, P. D. (1991) en *Advances in Immunology*, Vol. 49 (Dixon, D. J., ed.), págs. 281-355, Academic Press, Inc., Orlando, Fla.; Fox B. A. y col. (1990) *J. Biol. Response Mod.* 9: 499-511.

35 En algunas realizaciones se seleccionan antígenos del grupo constituido por un antígeno asociado a tumor (AAT), un antígeno específico de tumor (AET) y/o un antígeno específico de tejido. Estos antígenos incluyen, pero sin limitación, AAT de melanoma que incluyen, pero sin limitación, MART-1 (Kawakami y col. *J. Exp. Med.* 180: 347-352, 1994), MAGE-1, MAGE-3, GP-100, (Kawakami y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6458-6462, 1994), ACE y tirosinasa (Brichard y col. *J. Exp. Med.* 178: 489, 1993), los AAT tales como MUC-1, MUC-2, el oncogén ras con mutación puntual y los oncogenes p53 con mutación puntual (cáncer pancreático), CA-125 (cáncer de ovario), APE (cáncer de próstata), c-erb/B2 (cáncer de mama), antígeno KS 1/4 del pancarcinoma (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142: 3662-3667; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu y col., 1991, *Cancer Res.* 51(2): 468-475), ácido fosfato prostático (Tailor y col., 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(16): 4928), antígeno prostático específico (APE) (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160(2): 903-910; Israeli y col., 1993, *Cancer Res.* 53: 227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin y col., 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6): 445-446), antígeno gp75 asociado a melanoma (Vijayasardahl y col., 1990, *J. Exp. Med.* 171(4): 1375-1380), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (AAM-APM) (Natali y col., 1987, *Cancer* 59: 55-63; Mittelman y col., 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (ACE) (Foon y col., 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294), antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno globular de grasa de leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: ACE, TAG-72 (Yokata y col., 1992, *Cancer Res.* 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar y col., 1993, *Int. J. Cancer* 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn y col., 1982, *J. Clin. Immunol.* 2: 135), CTA-1 y AEL, antígeno 38.13, CD19 de linfoma de Burkitt- (Ghetie y col., 1994, *Blood* 83: 1329-1336), antígeno CD20 de linfoma B humano (Reff y col., 1994, *Blood* 83: 435-445), CD33 (Sgouros y col., 1993, *J. Nucl. Med.* 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma tales como el gangliósido GD2 (Saleh y col., 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara y col., 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 373-380), gangliósido GM2 (Livingston y col., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon y col., 1993, *Cancer Res.* 53: 5244-5250), antígenos de superficie celular de tipo trasplante específico de tumor (ATET) tales como antígenos tumorales inducidos viralmente

incluyendo virus de tumores de ADN T-antigénicos y antígenos de Envoltura de virus tumorales de ARN, alfafetoproteína antigénica oncofetal tal como ACE de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom y col., 1985, Cancer. Res. 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como el antígeno L6 del carcinoma de pulmón humano, L20 (Hellstrom y col., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno-Gp37 de linfocitos T de leucemia humana (Bhattacharya-Chatterjee y col., 1988, J. of Immuno specifically. 141: 1398-1403), neoglicoproteínas, esfingolípidos, antígeno de cáncer mamario tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento Epidérmico), antígeno HER2 (p185<sup>HER2</sup>), mucina epitelial polimórfica (MEP) (Hilkens y col., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359), antígeno-APO-1 linfocítico humano maligno (Bernhard y col., 1989, Science 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57) tal como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales, endodermo primario, antígeno I encontrado en eritrocitos adultos, embriones de preimplante, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrados en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D<sub>156-22</sub> encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma pulmonar, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le<sup>y</sup> encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, series de E<sub>1</sub> (grupo sanguíneo B) encontradas en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le<sup>a</sup>) encontrado en Adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le<sup>b</sup>), G49 encontrado en el receptor del EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALe<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>) encontrado en adenocarcinoma colónico, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T<sub>5A7</sub> encontrado en células mieloides, R<sub>24</sub> encontrado en melanoma, 4.2, G<sub>D3</sub>, D1.1, OFA-1, G<sub>M2</sub>, OFA-2, G<sub>D2</sub>, y M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en péptidos derivados de receptores de linfocitos T de embriones de fase de 4 a 8 células de Linfoma de linfocitos T Cutáneos (Edelson, 1998, The Cancer Journal 4: 62), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , mutantes IFN- $\beta$  17, IFN-65, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD21, CD28, CD32, CD34, CD35, CD40, CD44, CD45, CD54, CD56, OX40L, 4-1BBL, K2, K1, P $\beta$ , O $\alpha$ , M $\alpha$ , M $\beta$ 2, M $\beta$ 1, Hepsina, Pim-1, LMP1, TAP2, LMP7, TAP1, TRP, O $\beta$ , IA $\beta$ , IA $\alpha$ , IE $\beta$ , IE $\alpha$ , CYP21, C4B, CYP21P, C4A, Bf, C2, HSP, G7a/b, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , D, L, Qa, T1 $\alpha$ , COL11A2, DP $\beta$ 2, DP $\alpha$ 2, DP $\beta$ 1, DP $\alpha$ 1, DN $\alpha$ , DM $\alpha$ , DM $\beta$ , LMP2, TAPi1, LMP7, DO $\beta$ , DQ $\beta$ 2, DQ $\alpha$ 2, DQ $\beta$ 3, DQ $\beta$ 1, DQ $\alpha$ 1, DR $\beta$ , DR $\alpha$ , G250, HSP-70, HLA-B, HLA-C, HLA-X, HLA-E, HLA-J, HLA-A, HLA-H, HLA-G, HLA-F, factor de crecimiento nervioso, somatotropina, somatomedinas, parathormona, FSH, LH, EGF, TSH, factor liberador de THS, HGH, GRHR, PDGF, IGF-I, IGF-II, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF1, eritropoyetina, h-HCG, 4-N-acetilgalactosaminiltransferasa, GM2, GD2, GD3, JADE, MART, BAGE, GAGE, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, XAGE, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-18, ICAM-1, C-CAM, V-CAM, ELAM, NM23, EGFR, E-cadherina, N-CAM, LFA-3 (CD58), EpCAM, B7.1, CEA, DCC, PSA, Her2-neu, UTAA, antígeno de melanoma p75, K19, HKer 8, pMel 17, TP10, proteínas relacionadas con tirosinasa 1 y 2, p97, p53, RB, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC y MCC, ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk, ret, gsp, hst, bcl y abl, C1q, C1r, C1s, C4, C2, Factor D, Factor B, properdina, C3, C5, C6, C7, C8, C9, C11nh, Factor H, proteína de unión a C4b, DAF, proteína cofactor de membrana, proteína S inactivadora de anafilatoxina, HRF, MIRL, CR1, CR2, CR3, CR4, receptor de C3a/C4a, receptor de C5a, antígenos del Virus de Epstein-Barr (EBNA), BZLF-1, BXLF-1 y Proteínas de la Matriz Nuclear, AAT o AET modificados, variantes de corte y empalme de AAT o AET, epítopos funcionales, agonistas de epítopos y variaciones de ácidos nucleicos degeneradas de las mismas.

En algunas realizaciones importantes, los antígenos incluyen: mucina 1 (MUC1), mucina 2 (MUC2), BAGE-1, GAGE-1-8; GnTV, HERV-K-MEL, KK-LC-1, KM-HN-1, LAGE-1, MAGE-A1-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-C3, NA88, NY-ESO-1 / LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-2, SSX-4, TAG-1, TAG-2, TRAG-3, TRP2-INT2, XAGE-1b, antígeno carcinoembrionario (ACE), CA-125, gp100 / Pmel17, Calicreína 4, globina A de mamífero, Melan-A / MART-1, NY-BR-1, OA-1, antígeno prostático específico (APE), RAB38 / NY-MEL-1, TRP-1 / gp75, TRP-2, tirosinasa, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CPSF, ciclina D1, DKK1, ENAH (hMena), Ep-CAM, EphA3, EZH2, FGF5, G250 / MN / CAIX, HER-2 / neu, IL13Ralpha2, carboxil esterasa Intestinal, alfa fetoproteína (AFP), M-CSF, MCSP, mdm-2, MMP-2, MUC1, PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RGS5, RNF43, RU2AS, secernina 1, SOX10, STEAP1, survivina, Telomerasa, VEGF, WT1, alfa-actinina-4, ARTC1, proteína de fusión BCR-ABL, B-RAF, CASP-5, CASP-8, beta-catenina, Cdc27, CDK4, CDKN2A, COA-1, proteína de fusión dek-can, EFTUD2, factor de Elongación 2, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, proteína de fusión LDLR-fucosil-transferasaAS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, MART2, ME1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, neo-PAP, Miosina de clase I, NFYC, OGT, OS-9, p53, proteína de fusión pml-RARalfa, PRDX5, PTPRK, K-ras, N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, o la proteína de fusión SYT-SSX1 o SSX2, TGF-betaRII y Triosafosfato Isomerasa.

En algunas realizaciones, los genes de interés son aquellos que codifican un antígeno de un microorganismo patógeno causante de enfermedad. Estos incluyen virus tales como hemaglutinina del virus gripal (nº de acceso Genbank J02132; Air, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7639-7643; Newton y col., 1983, Virology 128: 495-501), glucoproteína G del virus sincitial respiratorio humano (nº de acceso Genbank Z33429; García y col., 1994, J. Virol.; Collins y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7683), proteína del núcleo, proteína de la matriz u otras proteínas del virus del Dengue (nº de acceso Genbank M19197; Hahn y col., 1988, Virology 162: 167-180), hemaglutinina del virus del sarampión (nº de acceso Genbank M81899; Rota y col., 1992, Virology 188: 135-142), glucoproteína gB de tipo 2 del virus del herpes simple (nº de acceso Genbank M14923; Bzik y col., 1986, Virology 155: 322-333), VP1 de poliovirus I (Emini y col., 1983, Nature 304: 699), glucoproteínas de envoltura del VIH I (Putney y col., 1986, Science 234: 1392-1395), antígeno de superficie de hepatitis B (Itoh y col., 1986, Nature 308: 19; Neurath y col., 1986,

Vaccine 4: 34), toxina de la difteria (Audibert y col., 1981, Nature 289: 543), epítipo 24M de *Streptococcus* (Beachey, 1985, Adv. Exp. Med. Biol. 185: 193), pilina gonocócica (Rothbard y Schoolnik, 1985, Adv. Exp. Med. Biol. 185: 247), g50 del virus de la seudorrabia (gpD), g II del virus de la seudorrabia (gpB), gIII del virus de la seudorrabia (gpC), glucoproteína H del virus de la seudorrabia, glucoproteína E del virus de la seudorrabia, glucoproteína 195 transmisible por gastroenteritis, proteína de la matriz transmisible por gastroenteritis, glucoproteína 38 del rotavirus porcino, proteína capsidial del parvovirus porcino, antígeno protector de *Serpulina hydodysenteriae*, glucoproteína 55 de la diarrea viral bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la enfermedad de pie y boca, virus del cólera porcino, virus gripal porcino, virus de la fiebre porcina Africana, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa (por ejemplo, glucoproteína E o glucoproteína G del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa) o virus de la laringotraqueitis infecciosa (por ejemplo glucoproteína G o glucoproteína 1 del virus de la laringotraqueitis infecciosa), una glucoproteína del virus de La Crosse (Gonzales-Scarano y col., 1982, Virology 120: 42), virus de la diarrea de ternero neonatal (Matsuno e Inouye, 1983, Infection and Immunity 39: 155), virus de la encefalomielit equina de Venezuela (Mathews y Roehrig, 1982, J. Immunol. 129: 2763), punta toro virus (Dalrymple y col., 1981, in Replication of Negative Strand Viruses, Bishop and Compans (eds.), Elsevier, N. Y., pág. 167), virus de la leucemia murina (Steeves y col., 1974, J. Virol. 14: 187), virus de tumor mamario de ratón (Massey y Schochetman, 1981, Virology 115: 20), proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y/o antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de R.U. N° GB 2034323A publicada el 4 de junio de 1980; Ganem y Varmus, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56: 651-693; Tiollais y col., 1985, Nature 317: 489-495), antígeno del virus de la gripe equina o herpesvirus equino (por ejemplo neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Alaska 91, neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Miami 63, neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Kentucky 81, glucoproteína B del herpesvirus equino de tipo 1, y glucoproteína D del herpesvirus equino de tipo 1, antígeno del virus sincitial respiratorio bovino o del virus paragripal bovino (por ejemplo, proteína de adhesión al virus sincitial respiratorio bovino (BRSV G), proteína de fusión al virus sincitial respiratorio bovino (BRSV F), proteína de la nucleocápside del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV N), proteína de fusión del virus paragripal bovino de tipo 3 y la neuraminidasa-hemaglutinina del virus paragripal bovino de tipo 3), glucoproteína 48 o glucoproteína 53 del virus de la diarrea viral bovina, proteínas RSV virales, por ejemplo, glucoproteína F de RSV, glucoproteína G de RSV, proteínas virales gripales, por ejemplo neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, proteína viral del herpes simple, por ejemplo glucoproteína del herpesvirus simple, incluyendo, por ejemplo, gB, gC, gD y gE, VIH (antígenos GP-120, p17, GP-160, gag, po1, qp41, gp120, vif, tat, rev, nef, vpr, vpu, vpx), gripe (NP, hemaglutinina (antígeno HA), neuraminidasa, PB1, PB2, PA, NP, M1, M2, NS1, NS2)), papilomavirus (E1, E2, E3, E4, E5a, E5b, E6, E7, E8, L1, L2), adenovirus (E1A, E1B, E2, E3, E4, E5, L1, L2, L3, L4, L5), HSV (ribonucleótido reductasa,  $\alpha$ -TIF, ICP4, ICP8, 1CP35, proteínas relacionadas con LAT, antígenos gB, gC, gD, gE, gH, gI, gJ, y dD), papilomavirus humano, virus de la encefalitis equina, hepatitis (Antígeno de Superficie de Hep B (gp27s, gp36s, gp42s, p22<sup>c</sup>, pol, x)).

En algunas realizaciones, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo, pueden proceder de un virus patógeno tal como, un antígeno de un adenoviridae (por ejemplo, mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ejemplo, herpesvirus simple 1, herpesvirus simple 2, herpesvirus simple 5 y herpesvirus simple 6), leviviridae (por ejemplo, levivirus, enterobacteria fase MS2, alolevirus), *poxviridae* (por ejemplo, cordopoxivirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus y entomopoxivirinae), papovaviridae (por ejemplo, poliomavirus y papilomavirus), paramixoviridae (por ejemplo, paramixovirus, virus paragripal 1, mobilivirus (por ejemplo, virus del sarampión), rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), pneumovirinae (por ejemplo, pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), metapneumovirus (por ejemplo, pneumovirus aviar y metapneumovirus humano), picornaviridae (por ejemplo, enterovirus, rinovirus, hepatovirus (por ejemplo, virus de la hepatitis A humana), cardiovirus y aptovirus), reoviridae (por ejemplo, ortoreovirus, orbivirus, rotavirus, cipovirus, fijivirus, fitoreovirus y orizavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus de tipo B de mamífero, retrovirus de tipo C de mamífero, retrovirus de tipo C de ave, grupo de retrovirus de tipo D, retrovirus BLV-HTLV), lentivirus (por ejemplo virus 1 de la inmunodeficiencia humana y virus 2 de la inmunodeficiencia humana), espumavirus, flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alfavirus (por ejemplo, virus sindbis) y rubivirus (por ejemplo, virus de la rubéola), rbdoviridae (por ejemplo, vesiculovirus, lisavirus, efemerovirus, citorabdovirus, y necleorabdovirus), arenaviridae (por ejemplo, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lppy y virus lassa) y coronaviridae (por ejemplo, coronavirus y torovirus).

En algunas realizaciones importantes, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo puede proceder de un virus patógeno tal como el VIH, virus de la gripe, virus del dengue, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, papilomavirus humano, virus del Ebola, virus de Marburg, virus de la Rabia, virus de Hanta, virus del Nilo Occidental, los Coronavirus de tipo a SARS, el virus del herpes simple, el virus de la Varicela zóster, el virus de Epstein-Barr, el herpesvirus Humano 8, los Alfavirus o la encefalitis de St. Louis.

#### 60 **Enfermedades bacterianas, virales y parasitarias**

En algunas realizaciones, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo puede proceder de una bacteria patógena tal como Ántrax, Clamidia, Micobacteria, Legionela. Los protozoos patógenos incluyen, pero sin



limitación, Malaria, Babesiosis, Esquistosomiasis. Las bacterias patógenas incluyen, por ejemplo, *Aspergillus* y *Candida* invasiva.

5 En algunas realizaciones, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo puede proceder de una bacteria patógena tal como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Rickettsia typhi* o *Treponema pallidum*.

En algunas realizaciones, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo puede proceder de un hongo patógeno, incluyendo, pero sin limitación, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, y especies de *Aspergillus*.

10 En algunas realizaciones, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo puede proceder de un protozoo patógeno, tal como, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, especies de *Leishmania*, especies de *Trypanosoma* (africano y Americano), un *cryptosporidium*, especies de *Isospora*, *Naegleria fowleri*, especies de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Toxoplasma gondii*, o *Pneumocystis carinii*.

15 En algunas realizaciones importantes, el fragmento de proteína antigénico o inmunogénico o epítipo del agente infeccioso incluye Gag del VIH, proteasa, transcriptasa inversa, proteína de envoltura de longitud completa, Vpu, Tat y Rev, hemaglutinina gripal, nucleoproteína, proteína 1 de matriz (M1), proteína 1 no estructural (NS-1), antígenos de protección cruzada del virus del dengue compartidos por todos los serotipos principales de virus (por ejemplo la proteína 1 no estructural o NS1, el dominio III o EDIII de envoltura), proteína 1 de la cápside del virus de la Hepatitis A (VP-1); antígeno de superficie (HBsAg) y antígeno de núcleo (HB-cAg) del virus de la Hepatitis B, antígeno del núcleo de la Hepatitis C, proteínas E1, E2, p7, NS2, NS4 y NS4; E1, E2, L1, L2 del HPV; glucoproteína, nucleoproteína y proteína de la matriz del virus del Ébola y Marburg; glucoproteína del virus de la Rabia; nucleoproteína, glucoproteína de envoltura y proteína G1 del virus Hanta; gluproteínas de premembrana (prM) y envoltura (E) del virus del Nilo Occidental, Orf3 de Coronavirus de tipo SARS, proteína Spike, proteína de Nucleocápside y Membrana, glucoproteína B y D del Herpesvirus simple; glucoproteína E y B (gE, gB) de envoltura del virus de la Varicela-zóster, proteína 63 temprana inmediata (IE63), gp350 del virus de Epstein-Barr, gp110, antígeno 1 nuclear (EBNA-1), EBNA 2 y EBNA-3C, proteína de control del complemento de herpesvirus 8 Humano (KCP), glucoproteína B, ORF6, ORF61 y ORF65; antígeno de *M. tuberculosis* 85A, 85B, MPT51, PPE44, proteína de choque térmico de 65 kDa de micobacteria (ADN-hsp65), diana antigénica secretora temprana de 6 kDa (ESAT-6), SpaO y Hla de *Salmonella*, proteínas de membrana externa (OMP); OMP de *P. aeruginosa*, PcrV, OprF, OprI, PliA y ToxinaA mutada, antígeno protector (AP) de *B. anthracis*; proteína V de respuesta a bajos niveles de calcio (LcrV) de *Y. pestis*, proteína de fusión F1 y F1-V, lipoproteína asociada a péptidoglucano (PAL) de *Legionella*, mip, flagelos, OmpS, hsp60, proteína secretora principal (MSP), factor de actividad similar a proteasa de *Chlamydia* (CPAF), proteína de membrana externa principal (MOMP), lipoproteínas de membrana externa de *T. pallidum*, Ag2/Pra106 de *Coccidioides*, Prp2, fosfolipasa (P1b), alfa-manosidasa (Amn1), aspartil proteasa, Gel1, adhesina de superficie W1-1 de *Blastomyces dermatitidis*; GXM de *Cryptococcus neoformans* y sus mimotopos peptídicos y manoproteínas; hsp90-CA de *Candida albicans*, manoproteína de 65-kDa (MP65), aspartil proteinasa Secretora (Sap), Als1p-N, Als3p-N, Asp f 16, Asp f 2, Der p 1 y Fel d 1 de *Aspergillus*, rodlet A, PEP2, HSP90 de *Aspergillus*, catalasa de 90 kDa; antígeno 1 de membrana apical (AMA1) de *Plasmodium*, proteína de fase sexual de 25 kDa (Pfs25), proteína de membrana eritrocitaria 1 (PfEMP1), proteína de circumsporozoito (CSP), Proteína 1 de Superficie de Merozoito (MSP1); cisteína proteinasa de tipo III (CPC) de *Leishmania*, proteínas ribosomales (LRP), antígeno A2, histonas nucleosomales, HSP20, G46/M-2/PSA-2 proteína de superficie de promastigoto, antígeno LACK de *L. infantum*, GP63, LmST11, TSA, P4, NH36, papLe22, beta tubulina de *Trypanosoma* (STIB 806), proteína asociada a microtúbulos (MAP p15), cisteína proteasas (CP), proteínas gp15 y gp40 de superficie de *Cryptosporidium*, antígeno Cp23, p23; antígeno 1 de superficie de *Toxoplasma gondii* (TgSAG1), inhibidor 1 de proteasa (TgPI-1), proteínas MIC2, MIC3, ROP2, GRA1-GRA7 asociadas a superficie, glucoproteína de superficie principal (MSG) de *Pneumocystis carinii*, antígeno p55; antígeno Sm14, 21.7 y SmFim de *Schistosomiasis mansoni*, Proteína Tegumentaria Sm29, GST de 26 kDa, SjCTPI, SjC23, Sj22.7, o SjGST-32 de *Schistosoma japonicum*.

50 Los poxvirus recombinantes administrados como se describe en el presente documento comprenden antígenos que suscitan una respuesta inmunitaria en un sujeto. En determinadas realizaciones, los poxvirus pueden comprender adicionalmente citocinas o moléculas coestimuladoras. Pueden usarse citocinas, por ejemplo, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, o moléculas coestimuladoras, por ejemplo, B7.1, B7.2, como adyuvantes. En determinadas realizaciones, las citocinas o moléculas coestimuladoras pueden coadministrarse mediante co-inserción de los genes que codifican las moléculas en el vector pox recombinante o en un segundo poxvirus recombinante que se mezcla con el poxvirus recombinante que expresa el antígeno. Como alternativa, las citocinas pueden administrarse al huésped por separado por vía sistémica.

### **Inmunoestimulación**

60 En determinadas realizaciones el poxvirus recombinante que codifica el fragmento antigénico se modifica adicionalmente para incluir un inmunomodulador, tal como, por ejemplo, ADN que codifica un factor coestimulador de linfocitos T y/o una citocina, tal como interleucina (IL) (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12), un interferón (IFN) (por ejemplo, IFN- $\gamma$ ), un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o una molécula

accesoria (por ejemplo ICAM-1). La construcción de dichos vectores multivalentes, tales como vectores poxvirales, se encuentra dentro del nivel de experiencia en la técnica fundamentada en la presente divulgación. En algunos casos, puede ser deseable la coexpresión del agente inmunomodulador, tal como el factor coestimulador de linfocitos T y el antígeno por vectores múltiples. Puede ser deseable administrar una preparación sustancialmente pura, por ejemplo, del inmunomodulador para reforzar la eficacia de la vacuna.

En determinadas realizaciones, para la inserción en los poxvirus, los ácidos nucleicos incluyen moléculas coestimuladoras, moléculas accesorias y/o genes que codifican una citocina y/o un factor de crecimiento. Los ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, B7-1, B7-2, ICAM-1, CD40, CD40L, LFA-3, CD72, OX40L (con o sin OX40).

Los ejemplos de citocinas y factores de crecimiento incluyen, pero sin limitación: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factores de necrosis tumoral ( $TNF\alpha$  y  $TNF\beta$ ), factores de crecimiento de transformación ( $TGF\alpha$  y  $TGF\beta$ ), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factor de células madre (SCF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas, factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I y IGF-II), hormona del crecimiento, interleucinas 1 a 15 (IL-1 a IL-15), interferones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (IFN- $\alpha$  IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ), factor neurotrófico derivado de cerebro, neurotrofinas 3 y 4, factor de crecimiento de hepatocitos, eritropoyetina, mitógenos similares a EGF, factores de crecimiento similares a TGF, factores de crecimiento similares a PDGF, factor de crecimiento de melanocitos, factor de crecimiento 1 derivado de mama, factores de crecimiento de próstata, factor de crecimiento derivado de cartílago, factor de crecimiento de condrocitos, factor de crecimiento derivado de hueso, factor de crecimiento derivado de osteosarcoma, factor de promoción del crecimiento glial, factor de crecimiento básico de calostro, factor de crecimiento de células endoteliales, factor de angiogénesis tumoral, factor de crecimiento de células madre hematopoyéticas, factor 2 estimulador de linfocitos B, factor de diferenciación de linfocitos B, factor de crecimiento derivado de leucemia, factor de crecimiento mielomonocítico, factor de crecimiento derivado de macrófagos, factor activador de macrófagos, actividad potenciadora eritroide, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de células de Schwann, factor de crecimiento del virus de la vacuna, bombixina, factor de diferenciación de neu, v-Sis, factor de crecimiento glial/actividad inductora del receptor de acetilcolina, transferrina, bombesina y péptidos similares a bombesina, angiotensina II, endotelina, factor natriurético auricular (ANF) y péptidos similares a ANF, péptido intestinal vasoactivo, RANTES, Bradiquinina y factores de crecimiento relacionados.

En algunas de las realizaciones preferidas, la molécula coestimuladora, factor de crecimiento, adyuvante o citocina es IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27, B7-1, B7-2, LFA-3, B7-H3, CD40, CD40L, ligando ICOS, OX-40L, 4-1BBL, GM-CSF, SCF, FGF, ligando Flt3, CCR4, QS-7, QS-17, QS-21, oligonucleótidos CpG, ST-246, AS-04, mutante LT R192G, Montanide ISA 720, proteínas de choque térmico, cofactor micobacteriano sintético (CAF01), miméticos de Lípido A, serovariedad de *Salmonella enterica*, *Typhimurium flagellin* (FltC), Montanide 720, Levamisol (LMS), Imiquimod, Toxina Diftérica, IMP321, AS02A, AS01B, AS15-SB, Alhidrogel, Montanide ISA, hidróxido de aluminio, MF59, IS-COMATRIX, MLPA, MPL y otros ligandos de TLR-4, MDP y otros ligandos de TLR-2, AS02A, AS01B, Toxina Termolábil LTK63 y LT-R192G.

En algunas realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos que expresan dominios antigénicos en lugar de toda la proteína. Por ejemplo, si se desea una reacción inmunitaria, solo se requiere codificar el fragmento necesario para estimular la reacción inmunitaria. Las moléculas coestimuladoras, moléculas accesorias y citocinas descritas en el presente documento son útiles como adyuvantes, que pueden administrarse por vía sistémica al hospedador mediante la inserción de ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas en los mismos, o diferentes, vectores poxvirales recombinantes. En una realización, se administra un vector poxviral que contiene B7, LFA-3 e ICAM-1 junto con el antígeno asociado a tumor. En una realización adicional, el poxvirus también contiene OX40L. Otros adyuvantes útiles que pueden administrarse por separado de los poxvirus son, por ejemplo, RIBI Detox (Ribi Immunochemical), QS21 (Aquila), adyuvante incompleto de Freund.

En algunas realizaciones, se proporcionan poxvirus que expresan B7-1, ICAM-1 y LFA-3, también conocidos como TRICOM, que inducen la activación de linfocitos T tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$ . (Patente de Estados Unidos N° 6.045.802; Hodge y col., J. Natl. Cancer Inst. 92: 1228-39 (2000); Hodge y col., Cancer Research 59: 5800-07 (1999)). OX40 es un coestimulador primario de linfocitos T en el que se ha encontrado un antígeno, en lugar de linfocitos T vírgenes, y que promueve la expansión de linfocitos T después de inducir tolerancia a los linfocitos T (Bansal-Pakal y col., Nature Med. 7: 907-12 (2001)). El OX40L desempeña una función durante la activación de los linfocitos T, a) manteniendo la proliferación prolongada de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , b) potenciando la producción de citocinas Th1 tales como IL-2,  $IGN-\gamma$  y  $TNF-\alpha$  de linfocitos T tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$  sin cambiar la expresión de IL-4, c) protegiendo a los linfocitos T de la apoptosis. En determinadas realizaciones, la combinación de B7-1, ICAM-1, LFA-3 y OX40L potencia la activación inicial y después potencia adicionalmente la activación sostenida de linfocitos T vírgenes y efectores.

Los poxvirus descritos en el presente documento no se replican en la célula diana. Como resultado de esto y de la naturaleza citoplasmática no integrativa opcional del vector poxviral, el sistema vectorial no producirá la replicación ni la infección de otras células. Por tanto, las células infectadas con poxvirus no afectarán de modo adverso a las

células en el hospedador en localizaciones distantes en las que se encuentra la célula diana.

En algunas realizaciones, el poxvirus modificado también puede tener características alteradas concernientes a aspectos del ciclo de vida viral, tales como la especificidad de las células diana, la vía de infección, la tasa de infección, tasa de replicación, tasa de ensamblaje de virión y/o tasa de propagación viral.

- 5 En algunas realizaciones, los poxvirus descritos en el presente documento pueden infectar células huésped en un huésped. Las células huésped son cualquier célula susceptible a infección por el poxvirus y capaz de expresar el genoma del poxvirus; incluyendo cualquiera de los genes exógenos insertados en su interior, por ejemplo, que codifican un antígeno, a niveles suficientes para suscitar una respuesta inmunitaria del huésped contra el antígeno.

- 10 Los poxvirus descritos en el presente documento pueden usarse para cualquier huésped. En algunas realizaciones, el huésped es un huésped mamífero, tal como un ave, un pez y similar. En algunas realizaciones, el huésped es un mamífero. Los mamíferos incluyen primates tales como seres humanos y chimpancés, animales domésticos tales como caballos, vacas, cerdos, etc. y mascotas tales como perros y gatos, así como roedores, tales como ratones, ratas y hámsters.

#### Cultivo del vector viral en células huésped

- 15 La introducción del vector viral portador del gen a administrar a la célula huésped diana puede efectuarse mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

- 20 La mayoría de las vacunas virales, tales como de virus atenuados o recombinantes, se preparan a partir de sistemas de cultivo celular. Las células usadas para la producción de virus/vacunas pueden ser líneas celulares, es decir, células que crecen de manera continuada *in vitro*, bien como un cultivo en suspensión unicelular en biorreactores o como una monocapa en una superficie de soporte celular de matraces o frascos giratorios de cultivo tisular. Para la preparación de vacunas no solo pueden utilizarse líneas celulares sino también células primarias de animales. Por ejemplo, la subfamilia *Chordopoxvirinae*, en particular MVA, se amplifica en cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) primarios o secundarios. Las células se obtienen de embriones de huevos de pollo que se incuban durante 10 a 12 días. Después, las células de los embriones se disocian y purifican. Estas células FEP primarias pueden usarse bien directamente o después de un pase celular adicional como células FEP secundarias. Posteriormente, las células FEP primarias o secundarias se infectan con el MVA. Para la amplificación del MVA las células infectadas se incuban durante 2-3 días a 37 °C (véase, por ejemplo, Meyer, H. y col. 1991; J. of General Virology 72, 1031-1038; Sutter y col. 1994, Vaccine, Vol. 12, N° 11, 1032-1040). Las células FEP se usan con frecuencia dado que muchas vacunas de virus se preparan atenuando el virus virulento causante de la enfermedad a través de pases en serie en células FEP. Los virus atenuados, tales como el MVA, no se propagan preferentemente en células humanas dado que preocupa el hecho de que los virus podrían volverse competentes en cuanto a la replicación en células de origen humano. Los virus que han recuperado la capacidad de replicarse en células humanas representan un alto riesgo si se administran a seres humanos, en particular si los individuos están inmunocomprometidos. Por esta razón, algunos virus atenuados, tales como el MVA, se preparan estrictamente a partir de células FEP, si se destinan para su uso en seres humanos. Además, las células FEP se usan para aquellos virus que solo crecen en estas células, por ejemplo virus aviáres, tales como avipoxvirus, poxvirus de canario, ALVAC, poxvirus de aves de corral y NYVAC.

- 40 En determinadas realizaciones, las células huésped, tales como células epiteliales epidérmicas, fibroblastos o células dendríticas, infectadas con los virus recombinantes expresan el antígeno (o antígenos) y pueden expresar adicionalmente la molécula (o moléculas) inmunoestimuladora. En estas realizaciones, el antígeno puede expresarse en la superficie celular de la célula huésped infectada. La molécula inmunoestimuladora puede expresarse en la superficie celular o la célula huésped puede secretarla de manera activa.

- 45 La expresión, tanto del antígeno como de la molécula inmunoestimuladora, puede proporcionar el péptido limitado al MHC necesario contra linfocitos T inmunovigilantes específicos y la señal apropiada contra el linfocito T en la piel para ayudar al reconocimiento antigénico y a la proliferación o expansión clonal de los linfocitos T específicos de antígeno. El resultado global puede ser una regulación positiva del sistema inmunitario. En determinadas realizaciones la regulación positiva de la respuesta inmunitaria es un aumento en los linfocitos T auxiliares específicos de antígeno y/o linfocitos citotóxicos, incluyendo, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> o mediados por linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> Th1 o Th2, que pueden destruir o inhibir el crecimiento de un agente causante de enfermedad (tal como una célula cancerosa) o una célula infectada con un agente causante de enfermedad (tal como una célula infectada con un virus, una bacteria, un hongo o un protozoo). En determinadas realizaciones, la inmunoestimulación también puede implicar una respuesta de anticuerpos que comprende generaciones de una o más clases de anticuerpos, tales como IgM, IgG y/o IgA.

#### Procedimientos para determinar respuestas inmunitarias

- 55 En la técnica se conocen procedimientos para determinar respuestas inmunitarias. Las lesiones virales pueden examinarse para determinar la aparición de una respuesta inmunitaria contra el virus y/o el antígeno. Pueden usarse ensayos *in vitro* para determinar la aparición de una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de dichos ensayos *in vitro* incluyen ensayos ELISA y ensayos con linfocitos T citotóxicos (LTC). La respuesta inmunitaria puede medirse

detectando y/o cuantificando la cantidad relativa de un anticuerpo, que reconoce específicamente un antígeno en el suero de un sujeto que se ha tratado administrando el poxvirus vivo, modificado, no replicante o con replicación defectuosa, que comprende el antígeno, relativa a la cantidad del anticuerpo en un sujeto no tratado.

5 En la materia se conocen técnicas para ensayar y purificar anticuerpos en una muestra, e incluyen, por ejemplo, ensayos de tipo sándwich, ELISA y ELISpot. Los anticuerpos incluyen partes de anticuerpos, anticuerpos mamalianizados (por ejemplo humanizados), anticuerpos recombinantes o sintéticos y anticuerpos híbridos y monocatenarios.

10 Los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, pueden obtenerse por inmunización con los efectores inmunitarios o con sus fragmentos antigénicos y para inmunoensayos puede utilizarse cualquier tipo. En la técnica se conocen bien procedimientos para obtener ambos tipos de suero.

Los sueros policlonales se preparan de un modo relativamente fácil inyectando a un animal de laboratorio adecuado una cantidad eficaz del efector inmunitario, o su parte antigénica, recogiendo el suero del animal y aislando los sueros específicos mediante cualquiera de las técnicas de inmuoadsorbencia conocidas. Los anticuerpos producidos por este procedimiento pueden utilizarse prácticamente en cualquier tipo de inmunoensayo.

15 En un inmunoensayo se prefiere el uso de anticuerpos monoclonales debido a la capacidad de producirlos en grandes cantidades y a la homogeneidad del producto. La preparación de líneas de células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales obtenidos fusionando una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunogénica, puede efectuarse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

20 Los ensayos ELISA pueden usarse para determinar el nivel de anticuerpos específicos de isotipo, usando procedimientos conocidos en la materia. Pueden usarse ensayos con LCT para determinar la actividad lítica de los LTC, midiendo la lisis específica de las células diana que expresan un antígeno determinado.

25 Para medir la activación (por ejemplo grado de activación) pueden usarse inmunoensayos de células inmunitarias en la muestra. Las células inmunitarias en la muestra se refieren a células inmunitarias contenidas en muestras de cualquier fuente, incluyendo muestras de un paciente humano, un donante humano, un animal o una línea celular cultivada en un tejido. La muestra celular inmunitaria puede proceder de sangre periférica, nódulos linfáticos, médula ósea, timo, cualquier otra fuente de tejido que incluya tumor *in situ* o extirpado, o proceder de cultivos de tejidos u órganos. Antes del análisis, la muestra puede fraccionarse o purificarse para generar o enriquecer un subconjunto de células inmunitarias particular. Las células inmunitarias pueden separarse y aislarse de su fuente mediante técnicas convencionales.

30 Las células inmunitarias incluyen células que están o no en reposo, y las células del sistema inmunitario que pueden ensayarse incluyen, pero sin limitación, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK, *Natural Killer*), linfocitos citolíticos activados por linfocinas (LAK, *Lymphokine Activated Killer*), monocitos, macrófagos, neutrófilos, granulocitos, mastocitos, plaquetas, células de Langerhans, células madre, células dendríticas y células mononucleares de sangre periférica.

35 La actividad celular inmunitaria que puede medirse incluye, pero sin limitación, (1) proliferación celular midiendo la replicación celular o del ADN; (2) producción aumentada de citocinas, incluyendo mediciones específicas de citocinas tales como  $\gamma$ IFN, GM-CSF o TNF-alfa, IFN-alfa, IL-6, IL-10, IL-12; (3) destrucción o lisis dirigida mediada por células; (4) diferenciación celular; (5) producción de inmunoglobulina; (6) cambios fenotípicos; (7) producción de factores quimiotácticos o quimiotaxis, que significa la capacidad de responder a una quimiotactina con quimiotaxis; (8) inmunosupresión, por inhibición de la actividad de algún otro tipo de célula inmunitaria; (9) secreción de quimioquinas, tal como IP-10; (10) expresión de moléculas coestimuladoras (por ejemplo CD80, CD 86) y moléculas de maduración (por ejemplo, CD83), (12) regulación positiva de la expresión del MHC de clase II; y (13) apoptosis, que se refiere a la fragmentación de células inmunitarias activadas en determinadas circunstancias, tal como una indicación de activación anómala.

40 En la mayoría de los ensayos inmunitarios descritos pueden usarse moléculas indicadoras. Una molécula indicadora es una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección del anticuerpo unido al antígeno. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Las moléculas indicadoras más habitualmente usadas en este tipo de ensayos son moléculas que contienen enzimas, fluoróforos o radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes. En el caso de inmunoensayo enzimático, una enzima se conjuga con el anticuerpo secundario, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, puede usarse una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, que están disponibles para el experto en la materia. Las enzimas comúnmente usadas incluyen, entre otras, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta galactosidasa y fosfatasa alcalina. Los sustratos a usar con las enzimas específicas se seleccionan generalmente para la producción, después de la hidrólisis a través de la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con la enzima se

añade al primer complejo antígeno-anticuerpo, se permite su unión, y después se lava el reactivo sobrante. Después, al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo se le añade una solución que contenga el sustrato apropiado. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al anticuerpo secundario, proporcionando una señal visual cualitativa, que adicionalmente puede cuantificarse, normalmente mediante espectrofotometría, para producir una indicación de la cantidad de antígeno que está presente en la muestra. Como alternativa, compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan a través de iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía lumínica, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. El anticuerpo fluorescente marcado se permite que se una al primer complejo anticuerpo-antígeno. Tras retirar por lavado el reactivo no unido, el complejo terciario que permanece se expone después a la luz de una longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del antígeno de interés.

Son ejemplos de algunos inmunoensayos habituales:

Ensayo de Proliferación Celular: la proliferación celular inmunitaria activada pretende incluir el aumento del número de células, crecimiento celular, división celular o expansión celular, medido por el número de células, peso celular o por incorporación de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas u otras moléculas precursoras radiomarcadas(as). Como un ejemplo, la replicación del ADN se mide por incorporación de marcadores radioisotópicos. En algunas realizaciones, los cultivos de células inmunitarias estimuladas pueden medirse por síntesis de ADN mediante marcaje por pulsos de los cultivos con timidina tritiada ( $^3\text{H-Tdr}$ ), un precursor nucleosídico que se incorpora en el ADN recién sintetizado. La incorporación de timidina proporciona una medida cuantitativa de la tasa de síntesis de ADN, que normalmente es directamente proporcional a la tasa de división celular. La cantidad de timidina marcada con  $^3\text{H}$  incorporada en el ADN replicante de células cultivadas se determina mediante recuento por centelleo en un espectrofotómetro de centelleo líquido. Los recuentos de centelleo producen datos en recuentos por minuto (rpm) que después pueden usarse como una medición convencional de sensibilidad de las células inmunitarias. El rpm en cultivos de células inmunitarias en reposo puede restarse de o dividirse entre el rpm de las células inmunitarias sensibilizadas, lo que producirá un índice de proporción de estimulación.

La citometría de flujo también puede usarse para medir la proliferación midiendo el ADN con dispersión lumínica, el volumen de Coulter y la fluorescencia, siendo todas estas técnicas muy conocidas en la materia.

Ensayo de Producción de Citocinas potenciado: una medición de la estimulación de las células inmunitarias es la capacidad de las células para segregar citocinas, linfocinas u otros factores de crecimiento. La producción de citocinas, incluyendo mediciones específicas para citocinas tales como  $\gamma\text{IFN}$ , GM-CSF o TNF-alfa, también puede realizarse por radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), bioensayos o medición de los niveles de ARN mensajero. En general, con estos inmunoensayos, se usa un anticuerpo monoclonal contra la citocina que se va a medir para unirse específicamente a y por tanto identificar la citocina. Los inmunoensayos son muy conocidos en la técnica y pueden incluir ensayos tanto competitivos como inmunogénicos, tales como inmunoensayos directos de tipo sándwich, inmunoensayos inversos de tipo sándwich e inmunoensayos simultáneos.

En cada uno de los ensayos anteriores, la muestra que contiene la citocina se incuba con el anticuerpo monoclonal específico de citocina en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que las citocinas se unan a los anticuerpos monoclonales. En general, es deseable proporcionar condiciones de incubación suficientes para la unión de tantas citocinas y anticuerpos como sea posible, dado que esto maximizará la señal. Por supuesto, las concentraciones específicas de anticuerpos, la temperatura y el tiempo de incubación, así como otras condiciones de ensayo de este tipo, pueden modificarse, dependiendo de diversos factores incluyendo la concentración de citocina en la muestra, la naturaleza de la muestra y similar. Los expertos en la técnica podrán determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Ensayo de Lisis de Células diana por Células: otro tipo de indicador del grado de activación de las células inmunitarias es la lisis de células diana mediada por células inmunitarias, que pretende incluir cualquier tipo de destrucción celular, incluyendo actividad de linfocitos T citotóxicos, apoptosis y la inducción de lisis diana por moléculas segregadas de células inmunitarias que no están en reposo estimuladas para actividad. Las técnicas de lisis mediada por células mide típicamente la capacidad de las células inmunitarias estimuladas para lisar células diana marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ . La citotoxicidad se mide como un porcentaje de  $^{51}\text{Cr}$  liberado en células diana específicas en comparación con el porcentaje de  $^{51}\text{Cr}$  liberado de las células de control diana. La destrucción celular también puede medirse contando el número de células diana, o cuantificando una inhibición del crecimiento de la célula diana.

Ensayo de Diferenciación Celular: otro indicador de actividad celular inmunitaria es la diferenciación y maduración de células inmunitarias. La diferenciación celular puede evaluarse de varias maneras diferentes. Un procedimiento de este tipo es medir los fenotipos de las células. Los fenotipos de células inmunitarias y cualquier cambio fenotípico pueden evaluarse mediante citometría de flujo después de tinción inmunofluorescente usando anticuerpos

monoclonales que se unirán a proteínas de membrana características de diversos tipos de células inmunitarias.

Un segundo medio para evaluar la diferenciación celular es midiendo la función celular. Esto puede realizarse bioquímicamente, midiendo la expresión de enzimas, ARNm, genes, proteínas u otros metabolitos dentro de la célula, o segregados por la célula. También pueden usarse bioensayos para medir la diferenciación celular funcional.

5 Las células inmunitarias expresan una variedad de moléculas de superficie celular que puede detectarse mediante anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales. Las células inmunitarias que han experimentado diferenciación o activación también pueden contarse por tinción, para detectar la presencia de proteínas de superficie celular características mediante inmunofluorescencia directa en frotis fijos de células cultivadas.

10 Los linfocitos B maduros pueden medirse en inmunoensayos, por ejemplo, mediante antígenos de superficie celular incluyendo CD 19 y CD20 con anticuerpos monoclonal marcados con fluorocromos o pueden usarse enzimas para estos antígenos. Los linfocitos B que se han diferenciado en células plasmáticas pueden contarse por tinción para inmunoglobulinas intracelulares mediante inmunofluorescencia directa en frotis fijos de células cultivadas.

15 Ensayo de Producción de Inmunoglobulina: la activación de linfocitos B da como resultado pequeñas cantidades, aunque detectables, de inmunoglobulinas policlonales. Después de varios días de cultivo, estas inmunoglobulinas pueden medirse mediante procedimientos de radioinmunoensayo o mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

20 Los linfocitos B que producen inmunoglobulinas también pueden cuantificarse mediante ensayo hemolítico inverso en placa. En este ensayo, los eritrocitos se recubren con inmunoglobulinas anti ser humano de cabra o conejo. Estas inmunoglobulinas se mezclan con los linfocitos productores de inmunoglobulina activados y agar semisólido, y se añade complemento. La presencia de placas hemolíticas indica que hay células productoras de inmunoglobulina.

25 Ensayo de Factor Quimiotáctico: los factores quimiotácticos son moléculas que inducen o inhiben la migración de células inmunitarias en o fuera de los vasos sanguíneos, tejidos u órganos, incluyendo factores de migración celular. Los factores quimiotácticos de células inmunitarias pueden evaluarse mediante citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales marcados contra el factor o factores quimiotácticos a ensayar. Los factores quimiotácticos también pueden ensayarse por ELISA u otros inmunoensayos, bioensayos, niveles de ARN mensajero y por mediciones directas, tales como recuento celular, de desplazamientos de las células inmunitarias en cámaras de migración especializadas.

30 Ensayos Complementarios: cuando se añaden a células mononucleares de sangre periférica reciente, las células autólogas activadas *ex vivo* presentan una respuesta potenciada contra un antígeno "de recuerdo", que es un antígeno al cual se han expuesto previamente las células mononucleares de sangre periférica. Las células inmunitarias sensibilizadas o estimuladas deben potenciar otra respuesta de células inmunitarias contra un antígeno "de recuerdo" cuando se cultivan juntas. Estos ensayos se denominan ensayos "auxiliares" o "complementarios". En este ensayo se añaden células inmunitarias sensibilizadas o estimuladas a células inmunitarias autólogas, normalmente no tratadas, para determinar la respuesta de las células no tratadas. Las células sensibilizadas 35 añadidas pueden irradiarse para impedir su proliferación, simplificando la medición de la actividad de las células no tratadas. Estos ensayos pueden ser particularmente útiles en la evaluación de células para sangre expuesta a virus. Los ensayos complementarios pueden medir proliferación, producción de citocinas, y lisis de células diana como se describe en el presente documento.

40 Los procedimientos descritos anteriormente y otros procedimientos adicionales para determinar una respuesta inmunitaria son muy conocidos en la técnica.

#### Administración en la piel de vectores virales

45 La piel representa un sitio diana atractivo para suministrar antígenos debido a la alta concentración de células presentadoras de antígeno (CPA), precursores de CPA y células inmunitarias encontradas en este tejido, dando como resultado una respuesta inmunoprotectora potenciada. Al reproducir los procesos infecciosos naturales de los queratinocitos mediante el virus de la vacuna, que proporciona respuestas inmunitarias excepcionalmente fuertes contra genes de vacuna, los procedimientos descritos en el presente documento potencian de manera similar la 50 inmunidad de un sujeto contra antígenos heterólogos expresados por los poxvirus proporcionados en el presente documento, tales como otros virus, bacterias, hongos y antígenos contra el cáncer. La respuesta inmunitaria resultante puede proteger al sujeto inmunizado o puede ayudar a aliviar o a tratar la enfermedad causada por el agente presentador del antígeno si el sujeto ya ha desarrollado la enfermedad.

55 En algunas realizaciones, los poxvirus recombinantes que comprenden el antígeno descrito en el presente documento pueden administrarse en forma de una composición, que opcionalmente puede comprender uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado. Preferentemente, los transportadores farmacéuticamente aceptables no inducen por sí mismos una respuesta fisiológica, por ejemplo, una respuesta inmunitaria. Más preferentemente, el transportador farmacéuticamente aceptable no produce ningún efecto adverso o no deseado y no produce toxicidad excesiva. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa,

agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril y sus combinaciones. En Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J., edición actual) se proporcionan ejemplos adicionales de transportadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 Los poxvirus modificados se administran preferentemente mediante alteración mecánica de la epidermis (por ejemplo, por escarificación cutánea, raspado, abrasión o corte superficial). En la técnica se conocen procedimientos y dispositivos para alterar la piel y para depositar una sustancia en la epidermis de la piel. Los ejemplos de dispositivos para alterar la piel incluyen una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica o un abrasivo.

10 Los poxvirus de la invención y sus composiciones pueden administrarse en el compartimento epidérmico de la piel en cualquier forma farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, los poxvirus y sus composiciones se aplican en la piel y después un dispositivo que altera mecánicamente la epidermis (por ejemplo, un abrasivo) se desplaza o se frota sobre la piel y el poxvirus. En determinadas realizaciones, pueden usarse agujas de escarificación o agujas hipodérmicas para alterar la epidermis. Se prefiere usar una cantidad mínima de abrasión/alteración mecánica para producir el resultado deseado. La determinación de la cantidad de abrasión/alteración mecánica apropiada para un poxvirus seleccionado y/o su composición se encuentra dentro de la experiencia habitual en la técnica. En otra realización el poxvirus y/o su composición puede aplicarse en forma deshidratada a la superficie abrasiva del dispositivo de abrasión antes de la aplicación. En esta realización, se aplica un líquido reconstituyente en la piel en lugar de la administración y el dispositivo de abrasión recubierto con poxvirus (composición) se aplica a la piel en el lugar del líquido de reconstitución. Después se desplaza o se frota sobre la piel de tal manera que el poxvirus (composición) comienza a disolverse en el líquido de reconstitución sobre la superficie de la piel y se suministra simultáneamente con abrasión. Como alternativa, en el dispositivo (por ejemplo, una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica o un abrasivo) puede incluirse un líquido de reconstitución y liberarse para disolver el poxvirus (composición) a medida que el dispositivo se aplica sobre la piel para la alteración mecánica de la epidermis. Determinados poxvirus (composiciones) también puede recubrirse sobre el dispositivo (por ejemplo dispositivo de abrasión) en forma de un gel.

25 Pueden proporcionarse dispositivos (por ejemplo, una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica o un abrasivo) para dirigir exactamente el espacio epidérmico. Estos dispositivos pueden tener microprotrusiones sólidas o huecas. Las microprotrusiones pueden tener una longitud de hasta aproximadamente 1500 micras. Las microprotrusiones pueden tener una longitud de aproximadamente 200 a 1500 micras. Las microprotrusiones pueden tener una longitud de aproximadamente 300 a 1000 micras, o en el intervalo de aproximadamente 400 a 800 micras.

30 Los dispositivos (por ejemplo, una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica o un abrasivo) que pueden usarse en los procedimientos descritos en el presente documento son preferentemente dispositivos que pueden romper la piel, penetrar en la epidermis sin penetrar en la epidermis. En algunas realizaciones, el dispositivo penetra en el estrato corneo sin penetrar toda la epidermis.

35 En determinadas realizaciones, los poxvirus y composiciones a administrar usando los procedimientos descritos en el presente documento pueden aplicarse a la piel antes de la abrasión, de manera simultánea con abrasión, o después de la abrasión.

40 Se desvelan procedimientos para suministrar los poxvirus y sus composiciones en la epidermis de un sujeto, que comprenden las etapas de recubrir la capa externa de la piel de un paciente o un dispositivo (por ejemplo, un abrasivo o una aguja de escarificación o aguja hipodérmica) con el poxvirus y sus composiciones y desplazar el dispositivo a través de la piel del sujeto para proporcionar alteraciones mecánicas dejando surcos suficientes para permitir la entrada de los poxvirus y sus composiciones en la epidermis viable del sujeto.

45 Para conseguir las alteraciones mecánicas deseadas de la epidermis, el dispositivo (por ejemplo, un abrasivo o una aguja de escarificación o aguja hipodérmica) debe desplazarse a través de la piel del sujeto al menos una vez. La piel del sujeto puede alterarse en direcciones alternas. El dispositivo permite que el poxvirus y/o sus composiciones se absorban más eficazmente, permitiendo así aplicar menos poxvirus y sus composiciones en la piel del sujeto o recubrir menos el dispositivo. La superficie del dispositivo puede recubrirse con los poxvirus y/o con sus composiciones que se desean administrar al sujeto. En algunas realizaciones, los poxvirus y/o sus composiciones pueden ser un polvo dispuesto sobre la superficie del dispositivo de abrasión. Los poxvirus y/o sus composiciones a administrar pueden aplicarse directamente en la piel del sujeto antes de la aplicación y el desplazamiento del dispositivo sobre la piel del sujeto.

55 El dispositivo (por ejemplo, aguja de escarificación, aguja hipodérmica o abrasivo) y las microprotrusiones pueden fabricarse con un material plástico que no sea reactivo con la sustancia a administrar. Los materiales plásticos adecuados incluyen, por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliamidas, poliestirenos, poliésteres y policarbonatos como se conoce en la técnica. Como alternativa, las microprotrusiones pueden fabricarse con un metal tal como acero inoxidable, acero de tungsteno, aleaciones de níquel, molibdeno, cromo, cobalto, titanio y sus aleaciones, u otros materiales tales como silicio, cerámica y polímeros de vidrio. Las microprotrusiones metálicas pueden fabricarse usando diversas técnicas similares al grabado fotolitográfico de una oblea de silicio o micromecanizando usando un molino con punta de diamante como se conoce en la técnica. Las microprotrusiones también pueden fabricarse mediante grabado fotolitográfico de una oblea de silicio usando técnicas convencionales como se conoce

en la técnica. También pueden fabricarse de plástico mediante un proceso de moldeo por inyección, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de Estados Unidos N° de Serie 10/193.317.

5 La longitud y grosor de las microprotrusiones se seleccionan en función de la sustancia particular que va a administrarse y del grosor de la epidermis en el lugar donde va a aplicarse el dispositivo. Las microprotrusiones penetran la epidermis sin perforar o atravesar toda la epidermis. Las protrusiones penetran el estrato corneo sin perforar o atravesar sustancialmente toda la epidermis.

10 Los procedimientos de preparación de un sitio de administración sobre la piel incluyen la colocación del dispositivo (por ejemplo, microabrasivo, aguja de escarificación o aguja hipodérmica) contra la piel del paciente en el lugar deseado. El dispositivo se presiona suavemente contra la piel y después se desplaza sobre la piel o a través de ella. La distancia del recorrido del dispositivo puede variar dependiendo del tamaño del lugar de administración que se desee, definido por la zona de suministro que se desee. Las dimensiones del lugar de suministro se seleccionan para obtener el resultado previsto y pueden variar dependiendo de la sustancia y de la forma de la sustancia que va a suministrarse. En algunas realizaciones, el dispositivo se desplaza aproximadamente de 2 a 15 centímetros (cm).  
15 En algunas realizaciones, el dispositivo se desplaza para producir un sitio epidérmico mecánicamente alterado que tiene un área de superficie de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 300 cm<sup>2</sup>.

Después, el dispositivo puede separarse de la piel para exponer la zona epidérmica mecánicamente alterada y los poxvirus recombinantes y sus composiciones pueden aplicarse a la zona epidérmica mecánicamente alterada. En determinadas realizaciones, los poxvirus y/o sus composiciones a administrar pueden aplicarse a la superficie de la piel bien antes o simultáneamente con la alteración mecánica de la epidermis.

20 El grado de alteración mecánica de la epidermis depende de la presión aplicada durante el desplazamiento y del número de repeticiones con el dispositivo (por ejemplo, aguja de escarificación, aguja hipodérmica o abrasivo). El dispositivo puede separarse de la piel después de realizar la primera pasada y colocarse de nuevo sobre la posición inicial sustancialmente en el mismo lugar y posición. Después, el dispositivo se desplaza una segunda vez en la misma dirección y a la misma distancia. El dispositivo puede desplazarse repetidamente a través del mismo lugar en  
25 dirección alterna sin separarse de la piel después de realizar la primera pasada. Generalmente, se realizan dos o más pasadas con el dispositivo. El dispositivo puede pasarse hacia atrás y hacia adelante, solo en la misma dirección, en un patrón cuadrículado, circular o cualquier otro patrón durante un tiempo suficiente para alterar la epidermis a una profundidad adecuada para intensificar el suministro de los poxvirus y/o sus composiciones.

30 En los procedimientos descritos en el presente documento se puede usar cualquier dispositivo conocido en la técnica para alterar la epidermis mediante alteración mecánica. Estos dispositivos incluyen, por ejemplo, dispositivos microelectromecánicos (MEMS) con series de microagujas cortas o microprotrusiones, dispositivos de tipo papel de lija, raspadores, agujas de escarificación, agujas hipodérmicas y similares.

35 En algunas realizaciones, puede generarse una respuesta inmunitaria contra el antígeno administrando a un sujeto entre aproximadamente 100 veces a aproximadamente 100 veces menos ufp (unidades formadoras de placas) del poxvirus, construido como se ha descrito en el presente documento; cuando se aplica mediante alteración mecánica de la epidermis en comparación con vías de inyección convencionales. En determinadas realizaciones, puede generarse una respuesta inmunitaria específica contra el antígeno administrando entre aproximadamente 90 veces, 80 veces, 70 veces, 60 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 20 veces, 10 veces, 5 veces menos ufp del poxvirus cuando se aplica mediante alteración mecánica de la epidermis en comparación con vías de inyección  
40 convencionales. En algunas realizaciones para suscitar en el sujeto una fuerte respuesta inmunitaria, específica de antígeno, duradera, se requiere una sola deposición de poxvirus recombinante.

45 En algunas realizaciones, los poxvirus y/o sus composiciones, proporcionados en el presente documento, también pueden administrarse en un régimen de dosificación, por ejemplo, una administración inicial de un poxvirus y/o sus composiciones con administraciones de refuerzo posteriores. En realizaciones particulares, se administra una segunda dosis del poxvirus y/o sus composiciones en cualquier lugar de dos semanas a un año, preferentemente de uno a seis meses, después de la administración inicial. Adicionalmente, puede administrarse una tercera dosis después de la segunda dosis y desde tres meses a dos años, o incluso durante más tiempo, preferentemente de 4 a 6 meses, o de 6 meses a un año después de la administración inicial. El antígeno de refuerzo puede administrarse usando el mismo poxvirus, o como una proteína entera, una fracción peptídica inmunogénica de la proteína, otro  
50 vector viral recombinante, o ADN que codifica la proteína o péptido. En algunas realizaciones, se usan diferentes poxvirus. Por ejemplo, puede proporcionarse vaccinia después de un avipoxvirus (virus de la viruela aviar) tal como fowlpoxvirus (virus de la viruela de las aves de corral), o viceversa, En algunas realizaciones preferidas, no se requiere inmunización de refuerzo.

#### Kits para la administración de vectores virales

55 La invención también contempla el uso de kits. En un aspecto de la invención, se proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende el poxvirus. En una realización se proporciona un kit que comprende, uno o más recipientes cargados con uno o más de los siguientes componentes: un poxvirus vivo, modificado, no replicante, como se define en las reivindicaciones, que comprende un antígeno y opcionalmente comprende una molécula



coestimuladora, bien en forma deshidratada (por ejemplo liofilizada), como una sal, o en una solución, opcionalmente un segundo virus que comprende una molécula coestimuladora, bien en forma deshidratada (por ejemplo liofilizada), como una sal o en una solución opcionalmente una solución o gel para disolver o mezclar el virus (o los virus) y opcionalmente un adyuvante. Los kits contienen adicionalmente un dispositivo para alterar la epidermis. Junto con dicho kit puede haber instrucciones de cómo usar el kit y opcionalmente un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o comercialización de los productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicha nota la aprobación por parte de la agencia, la fabricación, el uso o comercialización para la administración en seres humanos.

También se desvelan procedimientos de tratamiento de enfermedades. El procedimiento implica estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto. El procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesite un poxvirus vivo, modificado, no replicante o con replicación defectuosa que comprende el antígeno en una cantidad suficiente para estimular la respuesta inmunitaria en el sujeto, en el que el poxvirus se administra a una epidermis del sujeto mecánicamente alterada y en el que la estimulación de la respuesta inmunitaria trata una enfermedad en el sujeto causada por el antígeno. El sujeto puede haberse expuesto al antígeno antes de la administración del poxvirus que comprende el antígeno.

Se desvela un procedimiento para proteger a un sujeto que corre el riesgo de exponerse a un antígeno o de desarrollar una enfermedad causada por un antígeno. El procedimiento comprende estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un poxvirus vivo, modificado, no replicante o con replicación defectuosa que comprende administrar el antígeno en una cantidad suficiente para estimular la respuesta inmunitaria, en el que el poxvirus se administra a una piel mecánicamente alterada, en el que la estimulación de la respuesta inmunitaria confiere protección del sujeto contra una enfermedad causada por el antígeno. El sujeto puede no haberse expuesto al antígeno antes de la administración del poxvirus que comprende el antígeno.

Los términos “tratar” o “tratamiento” de una enfermedad se usan en el presente documento para referirse a la mejoría de la afección de un sujeto que tiene la enfermedad. Esto puede incluir una mejoría parcial o completa.

En el caso del cáncer, el “tratamiento” del cáncer se refiere a inhibir completa o parcialmente la proliferación o metástasis de un cáncer o célula tumoral, así como inhibir cualquier aumento de la proliferación o metástasis de una célula cancerosa o tumoral. El tratamiento puede conducir a estasis, a la remisión parcial o completa de un tumor o puede inhibir la propagación metastásica del tumor.

En el caso de una enfermedad infecciosa, el “tratamiento” de la enfermedad infecciosa significa reducir completa o parcialmente la carga del agente infeccioso en el sujeto. La carga puede ser carga viral, y reducir la carga viral significa, por ejemplo, reducir el número de células infectadas con el virus, reducir la tasa de replicación del virus, reducir el número de nuevos viriones producidos, reducir el número de copias totales del genoma viral en una célula, en comparación con un sujeto no tratado. La carga puede ser de bacterias, levaduras, hongos, protozoos, helmintos, o de parásitos y reducir dicha carga significa, por ejemplo, reducir el número de bacterias, hongos, protozoos, helmintos, levaduras o parásitos en un huésped, reduciendo la tasa de crecimiento de población, reducir la propagación en el organismo del sujeto, reducir la cantidad de productos tóxicos producidos por las bacterias, levaduras, hongos, protozoos, helmintos o parásitos, en comparación con un sujeto no tratado.

Los términos “proteger” o “protección de” un sujeto de desarrollar una enfermedad o de volverse susceptible a una infección, como se indica en el presente documento, significa proteger parcial o completamente al sujeto. Como se usa en el presente documento, “proteger totalmente” significa que un sujeto tratado puede no desarrollar una enfermedad o una infección causada por un agente tal como un virus, una bacteria, hongo, protozoo, helminto y parásitos, o causada por una célula cancerosa. La expresión “proteger parcialmente”, como se usa en el presente documento, significa que un determinado subconjunto de sujetos puede protegerse totalmente de desarrollar una enfermedad o infección después del tratamiento, o que el sujeto puede no desarrollar una enfermedad o infección con la misma gravedad que la que un sujeto no tratado.

En el presente documento se proporciona un poxvirus para tratar y/o prevenir una infección (o enfermedad infecciosa) en un sujeto, preferentemente en un ser humano. El poxvirus recombinante que comprende el antígeno y/o sus composiciones se administra a una epidermis del sujeto mecánicamente alterada. Las infecciones o enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse mediante estos procedimientos están causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitación, bacterias, virus, hongos, protozoos, helmintos y parásitos.

Los ejemplos de virus que pueden tratarse mediante los procedimientos descritos en el presente documento, o para los cuales los procedimientos descritos en el presente documento confieren protección, incluyen, pero sin limitación, el VIH, el virus de la gripe, del dengue, de la Hepatitis A, B y C, el virus del papilomavirus humano, el virus del Ebola, de Marburg, de la Rabia, el virus de Hanta, el virus del Nilo Occidental, los Coronavirus de tipo SARS, el virus del herpes simple (VHS1 y VHS2), el virus de la Varicela zóster, el virus de Epstein-Barr, el herpesvirus Humano 8, los Alfavirus y la encefalitis de St. Louis.

Otros virus que pueden tratarse, o para los cuales los procedimientos descritos en el presente documento confieren protección incluyen, pero sin limitación: enterovirus (incluyendo, pero sin limitación, virus de la familia picornaviridae, tales como poliovirus, Coxsackievirus, echovirus), rotavirus, adenovirus y virus de la hepatitis, tales como hepatitis A, B, C D y E. Ejemplos específicos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, pero sin limitación:

5 Retroviridae (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o HIV-III; y otros aislados tales como HIV-LP; Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, Coxsackievirus humanos, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus);

10 Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del Ébola); Paramixoviridae (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Ortomixoviridae (por ejemplo, virus gripales); Bunyaviridae (por ejemplo, bunyavirus, flebovirus y Nairovirus); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la Hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (papilomavirus, poliomavirus); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); citomegalovirus (CMV); Poxviridae (virus de la viruela, virus de la vacuna, poxvirus); Iridoviridae (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y otros virus, virus de la laringotraqueobronquitis aguda, Alfavirus, herpesvirus asociados al sarcoma de Kaposi, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Nipah, virus Norwalk, Papilomavirus, virus paragripal y gripe aviar.

Las infecciones o enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse con los poxvirus y procedimientos descritos en el presente documento están causadas por bacterias, que incluyen, pero sin limitación, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia perstis*, *Francisella tularensis*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Rickettsia typhi* y *Treponema pallidum*.

Otras infecciones bacterianas que pueden tratarse, o para las cuales los procedimientos descritos en el presente documento confieren protección incluyen, pero sin limitación: especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococci* y especies de *Streptococcus*. Las bacterias gram negativas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación, *Helicobacter pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Mycobacteria* sps (por ejemplo *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* de Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic sps.), *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pertenu*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*.

Las enfermedades fúngicas que pueden tratarse o prevenirse usando los poxvirus y procedimientos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, especies de *Aspergillus*.

Otros hongos que pueden tratarse o para los cuales los procedimientos descritos en el presente documento confieren protección incluyen, pero sin limitación: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *Chlamydia trachomatis*.

Las enfermedades protozoarias o infecciones que pueden tratarse o prevenirse usando los poxvirus y procedimientos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, Malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), una especie de *Leishmania*, una especie de *Trypanosoma* (africano y americano), un *cryptosporidium*, una especie de Isospora, *Naegleria fowleri*, una especie de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis carinii*.

Los cánceres o tumores que pueden tratarse o prevenirse usando los poxvirus proporcionados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, melanoma, carcinoma de células escamosas cutáneas, carcinoma de células basales, cáncer de mama, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, cáncer de ovario de origen epitelial, adenocarcinoma, y leiomiomas colorrectal, adenocarcinoma y leiomiomas de estómago, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, adenocarcinomas ductales de páncreas, tumores pancreáticos endocrinos, carcinoma de células renales, carcinoma de células transicionales de riñón y vejiga, carcinoma de células escamosas de vejiga, cáncer tiroideo papilar, cáncer tiroideo folicular, cánceres cerebrales (astrocitoma, glioblastoma multiforme).

#### 55 Agentes adicionales para administrar con vectores virales

Los procedimientos para el tratamiento o prevención de una enfermedad descrita en el presente documento pueden comprender administrar agentes adicionales. Por tanto, el procedimiento (o procedimientos) para tratar o prevenir cáncer descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con uno o más agentes anticancerosos. Los ejemplos de fármacos anticancerosos que pueden usarse en las diversas realizaciones, incluyendo

composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits descritos en el presente documento, incluyen, pero sin limitación: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adoclesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; acetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; 5 dimesilato de bisnafida; bicelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; capsitabina; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; 10 propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flucitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo 15 interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-la; interferón gamma-lb; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina; clorhidrato de retamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; 20 meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurán; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; pipsulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; 25 semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfín; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazoferina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribino; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina, improsulfán, benzodepa, carbocuaona, trietilenmelamrina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolomelaina, clomafazina, novembicina, fenesterina, trofosfamida, estermustina, clorozotocina, gemzar, nimustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, aclacinomicinas, actinomicina F(1), azaserina, bleomicina, carrubicina, carzinofilina, cromomicina, daunorubicina, daunomicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, doxorubicina, olivomicina, plicamicina, porfiromicina, puromicina, tubercidina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, 6-mercaptopurina, ancitabina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, enocitabina, pulmozima, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, bestrabucilo, defofamida, demecolcina, elfornitina, acetato de eliptinio, etoglúcido, flutamida, hidroxurea, lentinán, fenamet, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, razoxano, 40 espirogermanio, tamoxifeno, taxotere, ácido tenuazónico, triaziquona, 2,2',2"-triclortrietilamina, uretano, vinblastina, vincristina, vindesina y agentes relacionados; 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína 1 morfogénica 45 antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores apoptóticos; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; 50 inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinil espermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 del virus del canario; capecitabina; carboxamida-aminotriazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; 55 colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatamo; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshdrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diacicuona; didemin B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; 60 dronabinol; duocarmicina SA; ebselén; ecomustina, edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirrelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; 65 idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimuladores; inhibidor

del receptor del factor 1 de crecimiento insulínico; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; iododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; cahalalida F; lamelarin-N-triacetato; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinán; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa leucocítico; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorrelina; levamisol; liarozol; análogo de poliaminas lineales; disacárido-peptido lipofilo; compuestos lipofilos de platino; lisoclinamida 7; loboplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; lutetio-texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspina; inhibidores de la matrisilina; inhibidores metaloproteinasas de la matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario mal emparejado; mitoguazona; mitolactol; análogos de la mitomicina; mitonafida; saporina-factor del crecimiento del fibroblastos; mitoxantina; mitoxantrona; mofaronteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; lípido monofosforílico A + pared celular sk de miobacterias; mopidamol; inhibidor múltiple de genes resistentes a fármacos; terapia basada en el supresor 1 de tumores múltiples; agente anticancerígeno de mostaza; micaperóxido B; extracto miobacteriano de la pared celular; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelin; nagrestip; naloxona + pentazocina; navapina; nafterpina; nartograstim; nedaplatina; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante nítrico; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrona; ondansetrona; oracina; inductor oral de la citocina; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; análogos del paclitaxel; derivados del paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano-polisulfato sódico; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perílico; fenazinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de la proteasoma; inmunomodulador basado en la proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina-fosfatasa; inhibidores de la purina-nucleósido-fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado de hemoglobina polioxitilénada; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetrona; inhibidores ras de la farnesil-proteína transferasa; inhibidores ras; inhibidor ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; roglitimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina sarCNU; sarcófitol A; sargramostim; miméticos Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos sensibles; inhibidores de transducción de la señales; moduladores de transducción de la señales; proteína mocateneria enlazadora de antígenos; sizofirano; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína enlazadora de somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamicina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista superactivo de péptidos intestinales vasoactivos; suradista; suramina; suainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; tamoxifen-metiyoduro; tauromustina; tazaroteno; tecogalano sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temporfina; temozolomida; teniposida; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoyetina; trombopoyetina mimética; timalfasina; agonista receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante del tiroides; etil-etioipurpurina de estaño; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topotecano; topsentina; toremifeno; factor totipotente de células madre; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de la tirosina-quinasa; tirfostinas; inhibidores UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema vector, terapia génica eritrocitaria; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; zinostatina estimálámero.

El procedimiento (o procedimientos) para tratar o prevenir infecciones (o enfermedades) bacterianas descritas en el presente documento puede usarse en combinación con uno o más agentes antibacterianos. Los agentes antibacterianos incluyen, pero sin limitación, aminoglucósidos, agentes de  $\beta$  lactama, cefalosporinas, macrolidas, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, pero sin limitación, Acedapsona, Acetosulfona Sódica, Alamecina, Alexidina, Clavulanato Potásico de Amdinocilina, Amdinocilina, Pivoxil Amdinocilina, Amiciclina, Arizifloxacina, Mesilato de Amifloxacina, Amicacina, Sulfato de Amicacina, ácido Aminosalicílico, Aminosalicilato sódico, Amoxicilina, Amfomicina, Ampicilina, Ampicilina Sódica, Apalcilin Sódica, Apramicina, Aspartocina, Sulfato de Astromicina, Avilamecina, Avoparcina, Azitromicina, Azlocilina, Azlocilina Sódica, Clorhidrato de Bacampicilina, Bacitracina, Metileno de Dislicilato de Bacitracina, Bacitracina de Cinc, Bambermicinas, Benzoiipas Cálculo, Beritromicina, Sulfato de Betamicina, Biapenem, Biniramicina, Clorhidrato de Bifenamina, Bispiritona Magsulfex, Butiacina, Sulfato de Butirosina, Sulfato de Capreomicina, Carbadox, Carbenicilina Disódica, Indanil Sódico de Carbenicilina, Fenil Sódico de Carbenicilina, Carbenicilina Potásica, Carumonam Sódica, Cefaclor, Cefadroxil, Cefamandol, Cefamandol Nafato, Cefamandol Sódico, Cefaparol, Cefatrizina, Cefazaflur Sódico, Cefazolina, Cefazolina Sódica, Cefbuperazona, Cefdinir, Cefditoren Pivoxil, Cefepima, Clorhidrato de Cefepima, Cefetecol, Cefixima, Clorhidrato de Cefmenoxima, Cefmetazol, Cefmetazol Sódico, Cefonicid Monosódico, Cefonicid Sódico, Cefoperazón Sódico, Ceforanida, Cefotaxime, Cefotaxime Sódico, Cefotetán, Cefotetán Disódico, Clorhidrato de Cefotiam, Cefoxitina, Cefoxitina Sódica, Cefpimizol, Cefpimizol Sódico, Cefpiramida, Cefpiramide Sódica, Sulfato de Cefpiroma, Proxetil Cefpodoxima, Cefprozil, Cefroxadina, Cefsulodina Sódica, Ceftazidime, Ceftazidime Sódico, Ceftibutén, Ceftizoxime Sódica, Ceftriaxona Sódica, Cefuroxime, Cefuroxime Axetil, Cefuroxime Pivoxetil, Cefuroxime Sódico, Cefacetil Sódico, Cefalexina, Clorhidrato de

- Cefalexina, Cefaloglicina, Cefaloridina, Cefalotina Sódica, Cefapirina Sódica, Cefradina, Clorhidrato de Cetociclina, Cetofenicol, Cloranfenicol, Palmitato de Cloranfenicol, Complejo de Pantotetano de Cloranfenicol, Succinato Sódico de Cloranfenicol, Fosfanilato de Clorhexidina, Cloroxilenol, Bisulfato de Clortetraciclina, Clorhidrato de Clortetraciclina, Cilastatina, Cinoxacina, Ciprofloxacina, Clorhidrato de Ciprofloxacina, Cirolemicina, Claritromicina, 5 Clavulanato Potásico, Clorhidrato de Clinafloxacina, Clindamicina, Clindamicina Dextrosa, Clorhidrato de Clindamicina, Clorhidrato Palmitato de Clindamicina, Fosfato de Clindamicina, Clorafimina, Cloxacilina Benzatino, Cloxacilina Sódica, Cloxiquina, Colistimetato, Colistimetato Sódico, Colistín Sulfato, Coumermicina, Coumermicina Sódica, Ciclacilina, Cicloserina, Dalfopristina, Dapsona, Daptomicina, Demeclociclina, Clorhidrato de Demeclociclina, Demeciclina, Denofungina, Diaveridina, Dicloxacilina, Dicloxacilina Sódica, Sulfato de Dihidrostreptomina, 10 Dipiritiona, Diritromicina, Doxiciclina, Doxiciclina Cálcica, Doxiciclina Fosfatex, Hiclate de Doxiciclina, Monohidrato de Doxiciclina, Droxacina Sódica, Enoxacina, Epicilina, Clorhidrato de Epiteciclina, Ertapenem, Eritromicina, Acistrato de Eritromicina, Estrolato de Eritromicina, Etilsuccinato de Eritromicina, Gluceptato de Eritromicina, Lactobionato de Eritromicina, Propionato de Eritromicina, Estearato de Eritromicina, Clorhidrato de Etambutol, Etionamida, Fleroxacina, Floxacilina, Fludalanina, Flumequina, Fosfomicina, Fosfomicina Trometamina, Fumoxicilina, Cloruro de Furazolio, Tartrato de Furazolio, Fusidato Sódico, Ácido Fusídico, Gatifloxacina, Genifloxacina, Sulfato de Gentamicina, Gloximonom, Gramicidina, Haloprogina, Hetacilina, Hetacilina Potásica, Hexedina, Ibafloracina, Imipenem, Isoconazol, Isepamicina, Isoniazid, Josamicina, Sulfato de Kanamicina, Kitamicina, Levofloxacina, Levofuraltadona, Levopropilicina Potásica, Lexitromicina, Lincomicina, Clorhidrato de Lincomicina, Linezolid, Lomefloxacina, Clorhidrato de Lomefloxacina, Mesilato de Lomefloxacina, Loracarbef, Mafenida, Meclociclina, 20 Sulfosilicato de Meclociclina, Fosfato Potásico de Megalomicina, Mequidox, Meropenem, Metaciclina, Clorhidrato de Metaciclina, Metenamina, Metenamina Hippurato, Metenamina Mandelato, Meticilina Sódica, Metioprim, Clorhidrato de Metronidazol, Fosfato de Metronidazol, Mezlocilina, Mezlocilina Sódica, Minociclina, Clorhidrato de Minociclina, Clorhidrato de Mirincamicina, Monensina, Monensina Sódica, Clorhidrato de Moxifloxacina, Nafcilina Sódica, Nalidixato Sódico, Ácido Nalidíxico, Natamicina, Nebramicina, Palmitato de Neomicina, Sulfato de Neomicina, 25 Undecilenato de Neomicina, Sulfato de Netilmicina, Neutramicina, Nifuradeno, Nifuraldezona, Nifuratel, Nifuratróna, Nifurdazil, Nifurimida, Nifurpirinol, Nifurquinazol, Nifurtiazol, Nitrociclina, Nitrofurantoina, Nitromida, Norfloxacina, Novobiocina Sódica, Ofloxacina, Ormetoprim, Oxacilina Sódica, Oximonam, Oximonam Sódica, Ácido Oxolínico, Oxitetraciclina, Oxitetraciclina Cálcica, Clorhidrato de Oxitetraciclina, Paldimicina, Paraclorofenol, Paulomicina, Pefloxacina, Mesilato de Pefloxacina, Penamecilina, Penicilina G Benzatina, Penicilina G Potásica, Penicilina G Procaína, Penicilina G Sódica, Penicilina V, Penicilina V Benzatina, Penicilina V Hidrabamina, Penicilina V Potásica, Pentizidona Sódica, Fenil Aminosalicilato, Piperacilina, Piperacilina Sódica, Pirbenicilina Sódica, Piridicilina Sódica, Clorhidrato de Pirimicina, Clorhidrato de Pivampicilina, Pamoato de Pivampicilina, Probenato de Pivampicilina, Polimixina B Sulfato, Porfiromicina, Propicacina, Pirazinamida, Piritona de Cinc, Acetato de Quindecamina, 30 Quinupristina, Racefenicol, Ramoplanina, Ranimicina, Relomicina, Repromicina, Rifabutina, Rifametano, Rifamexil, Rifamida, Rifarripina, Rifapentina, Rifaximina, Rolitetraciclina, Nitrato de Rolitetraciclina, Rosaramicina, Butirato de Rosaramicina, Propionato de Rosaramicina, Fosfato Sódico de Rosaramicina, Estearato de Rosaramicina, Rosoxacina, Roxarsona, Roxitromicina, Sanciclina, Sanfetrina Sódica, Sarmoxicilina, Sarpicilina, Escopafungina, Sisomicina, Sulfato de Sisomicina, Esparfloxacina, Clorhidrato de Espectinomicina, Espiramicina, Clorhidrato de Estalimicina, Estefimicina, Ticarcilina Disódica Estéril, Sulfato de Estreptomina, Estreptonicozida, Sulbactam Sódico, Sulfabenz, Sulfabenzamida, Sulfacetamida, Sulfacetamida Sódica, Sulfacitina, Sulfadiazina, Sulfadiazina Sódica, Sulfadoxina, Sulfaleno, Sulfamerazina, Sulfameter, Sulfametazina, Sulfametazol, Sulfametoxazol, Sulfamonometoxina, Sulfamoxol, Sulfanilato de Cinc, Sulfanitrán, Sulfasalacina, Sulfasomizol, Sulfatiazol, Sulfazamet, Sulfisoxazol, Acetil Sulfisoxazol, Diolamida de Sulfisoxazol, Sulfomixina, Sulopenem, Sultamicilina, Suncilina Sódica, Clorhidrato de Talampicilina, Tazobactam, Teicoplanina, Clorhidrato de Temafloxacina, Temocilina, 45 Tetraciclina, Clorhidrato de Tetraciclina, Complejo de Fosfato de Tetraciclina, Tetroxoprim, Tiamfenicol, Tifencilina Potásica, Cresil Sódico de Ticarcilina, Ticarcilina Disódica, Ticarcilina Monosódica, Ticlatona, Cloruro de Tiodonio, Tobramicina, Sulfato de Tobramicina, Tosufloxacina, Trimetoprim, Sulfato de Trimetoprim, Trisulfapirimidinas, Troleandomicina, Sulfato de Trospetomicina, Trovafloxacina, Tirotricina, Vancomicina, Clorhidrato de Vancomicina, Virginiamicina, Zorbamicina.
- 50 El procedimiento (o procedimientos) para el tratamiento o la prevención de las infecciones (o enfermedades) virales descritas en el presente documento puede usarse en combinación con uno o más agentes antivirales. Los agentes antivirales pueden aislarse de fuentes naturales o pueden sintetizarse y son útiles para destruir o inhibir el crecimiento o la función de los virus. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero sin limitación, 55 inmunoglobulinas, amantadina, interferones, análogos de nucleótidos e inhibidores de proteasa. Los ejemplos específicos de agentes antivirales incluyen, pero sin limitación, Acemanán; Aciclovir; Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Clorhidrato de Amantadina; Aranotina; Arildona; Mesilato de Ateviridina; Avidina; Cidofovir; Cipamilina; Clorhidrato de Citarabina; Mesilato de Delaviridina; Desciclovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudina; Envirodeno; Enviroxime; Famciclovir; Clorhidrato de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet Sódico; Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Ketoxal; Lamivudina; Lobucavir; Clorhidrato de Memotina; Metisazona; Nevirapina; Penciclovir; Pirodovir; Ribavirina; Clorhidrato de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Clorhidrato de Somantadina; Sorivudina; Estanolón; Estavudina; Clorhidrato de Tilorona; Trifluridina; Clorhidrato de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Fosfato de Vidarabina Sódica; Viroxime; Zalcitabina; Zidovudina; y Ziniviroxime.

Los agentes antivirales también incluyen análogos de nucleótidos. Los ejemplos de análogos de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: aciclovir (usado para el tratamiento del virus de herpes simple y del virus de la varicela zóster), ganciclovir (útil para el tratamiento de citomegalovirus), idoxuridina, ribavirina (útil para el tratamiento del virus sincitial respiratorio), didesoxiinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod y resiquimod.

- 5 Los interferones con citocinas que segregan las células infectadas con virus así como células inmunitarias. Los interferones actúan uniéndose a receptores específicos en células adyacentes a las células infectadas, causando el cambio en la célula que la protege de la infección por el virus. El interferón  $\alpha$  y  $\beta$  también induce la expresión de moléculas del MHC de Clase I y Clase II en la superficie de células infectadas, dando como resultado una presentación antigénica aumentada para el reconocimiento de células inmunitarias del huésped. Los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  están disponibles como formas recombinantes y se han usado para el tratamiento de infección de hepatitis B y C. crónica. A las dosificaciones que son eficaces para la terapia antiviral, los interferones tienen graves efectos secundarios, tales como fiebre, malestar y pérdida de peso.

- 15 El procedimiento (o procedimientos) para el tratamiento o la prevención de las infecciones (o enfermedades) fúngicas descritas en el presente documento puede usarse en combinación con uno o más agentes antifúngicos. Los ejemplos de agentes antifúngicos incluyen, pero sin limitación, imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol y voriconazol, así como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradamicina, UK 292, butenafina y terbinafina. Otros agentes antifúngicos actúan degradando quitina (por ejemplo, quitinasa) o por inmunosupresión (crema 501).

- 20 El procedimiento (o procedimientos) para el tratamiento o la prevención de infecciones (o enfermedades) protozoarias descritas en el presente documento puede usarse en combinación con uno o más agentes antiprotozoarios. Los ejemplos de agentes antiprotozoarios incluyen, pero sin limitación, albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, clorhidrato de cloroquina, fosfato de cloroquina, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, iodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, prazicuantel, fosfato de primaquina, proguanilo, pamoato de pirantelo, sulfonamidas de pirimetanmina, pirimetanmina-sulfadoxina, clorhidrato de quinacrina, quinina sulfato, gluconato de quinidina, espiramicina, estibogluconato sódico (gluconato de antimonio sódico), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol y triparsamida, algunos de los cuales se usan en solitario o en combinación con otros.

- 30 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

### Ejemplos

#### ***Ejemplo 1: la inmunización epidérmica con el VV mediante escarificación cutánea genera inmunidad celular y humoral significativamente más fuerte que las vías de inyección convencionales.***

- 35 Se desarrolló un modelo murino de escarificación cutánea con VV. La reacción pox epidérmica aguda desarrollada en ratones escarificados se parece mucho a la de las vacunas del virus de la viruela humana. Usando este modelo, se llevó a cabo una comparación rigurosa de la respuesta inmunoadaptativa primaria y de memoria después de inmunización con el virus de la vacuna (VV) mediante escarificación cutánea (e.c.), inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.) e intramuscular (i.m.). Aunque la vía de inyección intraperitoneal (i.p.), altamente inmunogénica, no se usó para la inmunización clínica, se incluyó como control positivo para respuestas inmunitarias específicas de VV. La escarificación cutánea con VV indujo respuestas de linfocitos T primarios y de memoria, significativamente más fuertes, así como niveles más altos de IgG específicas de VV en suero, en comparación con las vías de inyección convencionales (s.c., i.d., e i.m.) (Fig. 1). Los niveles prolongados de IgG en suero y de linfocitos T de memoria fueron comparables en ratones escarificados con VV y en ratones inmunizados por vía i.p. Por tanto, la inmunización epidérmica localizada con VV mediante escarificación cutánea consigue inmunogenicidad comparable con la de la infección por vía i.p. que estabiliza la infección viral sistémica, de acuerdo con la respuesta de IFN- $\gamma$  y el nivel de IgG en suero.

#### ***Ejemplo 2: la escarificación cutánea con VV proporciona protección superior contra exposición antigénica secundaria.***

- 50 Se determinó si la escarificación cutánea con VV podría proporcionar mejor protección contra exposición secundaria usando tres modelos diferentes. El primer modelo de exposición fue la infección cutánea con poxvirus (mediante infección cutánea). Este modelo se escogió por dos razones. En primer lugar, la eficacia protectora de los candidatos de la vacuna de la viruela se evaluó clínicamente por exposición de individuos vacunados con Dryvax mediante escarificación. En segundo lugar, la infección con poxvirus natural puede adquirirse mediante exposición cutánea contra los virus, especialmente en la zona de la piel lesionada. Después de la exposición cutánea, la carga viral en la piel se determinó mediante PCR en tiempo real específica de VV (Fig. 2). En comparación con los ratones de control no inmunizados, todos los ratones inmunizados mediante inyección s.c., i.d., e i.m. demostraron protección parcial, con una reducción de carga viral de 15, 9,5 y 3 veces, respectivamente. Se obtuvo una reducción de 3-log en la carga viral en ratones inmunizados por vía i.p. Sorprendentemente, todos los ratones previamente

inmunizados mediante escarificación cutánea eliminaron completamente el virus en ese momento. Por lo tanto, la escarificación cutánea proporciona protección superior contra exposición al poxvirus cutánea secundaria en comparación con las vías de inyección, incluyendo la vía de inyección i.p. altamente inmunogénica.

5 La infección con poxvirus natural se transmite principalmente mediante aerosol respiratorio. Por lo tanto, se evaluó la eficacia protectora de diversas vías de inmunización contra infección intranasal letal por el virus patógeno de la vacuna de la cepa Reserva Occidental (WR-VV). Como se muestra en las Figs. 3a, b, los ratones inmunizados mediante las vías de inyección s.c., i.d. e i.m. (a una dosis de  $2 \times 10^6$  ufp) desarrollaron dolencia clínica aparente (manifestada por la pérdida significativa de peso corporal, PC), y estuvieron solo parcialmente protegidos de mortalidad. En cambio, los ratones inmunizados por vía e.c. e i.p. estuvieron completamente protegidos con una supervivencia del 100 % y con cambios mínimos de PC. De hecho, la vía de escarificación cutánea obtuvo una mejor eficacia protectora que las vías s.c., i.d. e i.m. incluso a una dosis inferior a 1000 x (Figs. 3c, d). Por tanto, la inmunización con VV mediante escarificación cutánea protegió más eficazmente la mucosa respiratoria que las vías de inmunización convencionales.

15 Se investigó después si la protección superior asociada con la escarificación cutánea con VV podía extenderse a un modelo de exposición no viral. Se inmunizaron ratones C57B1/6 con el virus de la vacuna recombinante (rVV) que expresaba el epítipo  $K^b$  de la ovoalbúmina (OVA) Ova<sub>257-264</sub> mediante diferentes vías, y se expusieron a células de melanoma B16 que expresaban OVA intradérmicamente 5 semanas después de la inmunización. Dieciocho (18) días después de la implantación del tumor, todos los ratones inmunizados mediante las vías de inyección (s.c., i.d., i.m., e i.p.) desarrollaron una masa grande de melanoma cutáneo (Figs. 4a-d). Extraordinariamente, no se detectó tumor visible o palpable en ninguno de los ratones con escarificación cutánea (Fig. 4e). Aunque eventualmente se desarrolló tumor en todos los ratones expuestos a B16-OVA, el crecimiento tumoral se retrasó significativamente (Fig. 4f) y la supervivencia mejoró enormemente (datos no mostrados) en el grupo de escarificación en comparación con los otros grupos. Dado que la vacuna y las células tumorales solo comparten un único epítipo de célula T CD8, y que los ratones solo recibieron una única dosis de VV por escarificación cutánea, estos resultados extraordinariamente prometedores y tienen gran repercusión clínica. Es muy posible que, con el tiempo, la expresión de OVA se pierda de las células tumorales B16 con la selección inmunitaria, presentando una respuesta de memoria de linfocito T CD8<sup>+</sup> específico de Ova<sub>257-264</sub> ineficaz para suprimir el crecimiento tumoral.

***Ejemplo 3: Los linfocitos T de memoria, pero no el Ac, son necesarios para la protección asociada a escarificación cutánea con VV contra exposición secundaria.***

30 Para investigar el mecanismo subyacente de la eficacia protectora superior después de escarificación cutánea poxviral, se estudió la contribución relativa de la respuesta humoral y celular en la inmunoprotección asociada a la escarificación cutánea. Ratones  $\mu$ MT de tipo silvestre (ts) y con déficit de linfocitos B se inmunizaron con VV a través de escarificación cutánea o por inyección i.p., las dos vías más inmunogénicas de este estudio. Después, los ratones con memoria se expusieron a infección poxviral intranasal o cutánea secundaria. Como se muestra en la Fig. 5a, cuando los ratones  $\mu$ MT inmunizados por vía i.p. se exponen a VV cutánea, tienen una carga viral mayor de 4-log en comparación con la del resto de ratones de ts inmunizados por vía i.p.. Es interesante que los ratones  $\mu$ MT inmunizados mediante la vía de e. c. aún demostrasen fuerte protección contra la exposición cutánea, con una carga viral comparable a la de los ratones de ts inmunizados mediante escarificación cutánea. Sin embargo, cuando los linfocitos T se agotaron en los ratones de ts con memoria antes y durante la exposición (mediante un tratamiento con una dosis mayor de Acm anti-CD4 y anti-CD8), la inmunoprotección se anuló completamente en ambos grupos de inmunización e.c. e i.p.. Estos datos sugieren que aunque para la protección contra la exposición cutánea después de inmunización i.p. se requiere tanto Ac como linfocitos T, la respuesta de los linfocitos T de memoria en solitario después de escarificación cutánea con VV es suficientemente fuerte para controlar eficazmente la exposición cutánea. De hecho, la respuesta de linfocitos T secundaria tanto en bazo como en nódulos linfáticos (NL) de drenaje la piel expuesta fue significativamente más fuerte en ratones inmunes escarificados que la de los ratones inmunizados por vía i.p. (Fig. 5b, c). La diferencia entre los grupos de inmunización fue incluso más llamativa en los ratones  $\mu$ MT. Adicionalmente, se examinaron al microscopio tejidos de piel expuestos de diferentes grupos de ratones para detectar la presencia de linfocitos T. Sorprendentemente, se observó infiltración masiva de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en la epidermis basal y en la dermis de ratones inmunizados mediante la vía de e.c., aunque solo se dispersaron algunos linfocitos T en la piel recogida de los restantes grupos de inmunización (Fig. 5d). En su conjunto, estos datos sugieren que la escarificación cutánea con VV es excepcionalmente fuerte generando gran cantidad de linfocitos T<sub>me</sub> (con memoria efectora) de retorno dirigido a la piel, que son muy protectores contra una exposición antigénica cutánea secundaria.

55 De manera similar, la respuesta de los linfocitos T de memoria parecía ser más importante que la respuesta de Ac para una protección completa contra exposición intranasal. Ratones  $\mu$ MT y ts se inmunizaron con VV mediante escarificación cutánea y se expusieron letalmente a WR-VV mediante infección intranasal. Ambas cepas de ratones se protegieron completamente contra la mortalidad con cambios mínimo de PC. Sin embargo, el empobrecimiento de linfocitos T de los ratones de memoria ts condujo a una pérdida de PC más pronunciada, aunque todos los ratones inmunes con empobrecimiento de linfocitos T sobrevivieron a la exposición (Fig. 6). Estos datos sugieren que se generan linfocitos T<sub>me</sub> protectores que residen en, o pueden migrar rápidamente a, la pared epitelial respiratoria mediante inmunización epicutánea con VV a través de escarificación cutánea, junto con los linfocitos T<sub>me</sub>

de retorno dirigido. Estas células desempeñan un papel importante en la inmunovigilancia contra patógenos transmitidos por aerosol.

**Ejemplo 4: la escarificación cutánea con VV genera gran cantidad de linfocitos T<sub>ef</sub>/T<sub>ms</sub> de retorno dirigido así como linfocitos T con capacidad de retorno dirigido altamente versátil mediante programas de impronta de retorno dirigido tisular primario y secundario en NL regional.**

¿Cómo desarrollan los linfocitos T específicos de antígeno la capacidad de retorno dirigido altamente versátil para proporcionar inmunoprotección sistémica después de una infección con VV local limitada a la piel?

Esta cuestión se investigó con linfocitos T OT-I específicos de Thy1.1<sup>+</sup> Ova<sub>257-264</sub> marcados con CFSE en ratones ts Thy1.2<sup>+</sup> y posteriormente rastreando su activación, proliferación y migración *in vivo* después de infección mediante escarificación cutánea o i.p. con células rVV-Ova<sub>257-264</sub>. Las células OT-I proliferaron ampliamente dentro del NL inguinal (NLI) de drenaje cutáneo tan solo 60 h después de escarificación cutánea, mientras que se observó una proliferación similar en el NL mesentérico (NLM) de drenaje intestinal después de infección i.p. (Fig. 7a). Como se esperaba, estas células OT-I regularon negativamente, de manera significativa, la molécula CD62L de retorno dirigido al NL, que se expresaba altamente en linfocitos T vírgenes y T<sub>cm</sub> que circulaban entre los tejidos linfoides secundarios (Fig. 7b). Simultáneamente, hubo una fuerte regulación positiva de la molécula E-Lig y P-Lig (ligandos de selectina-P) de retorno dirigido a la piel en células OT-I activadas dentro del NLI, y molécula  $\alpha 4\beta 7$  de retorno dirigido al intestino en células OT-I activadas dentro del NLM. La expresión de las moléculas de retorno dirigido tisular se reguló positivamente después de 3 divisiones celulares y continuó aumentando en función de la división celular (Fig. 7c). Por tanto, poco después de la activación, se realizó la impronta de linfocitos T específicos de antígeno con un fenotipo de retorno dirigido específico de tejido en el NL regional donde se producía sensibilización (impronta de retorno dirigido primario). Esto permitió que los linfocitos T activados migrasen específicamente a los tejidos infectados tan solo 3 días después de la escarificación cutánea con VV (datos no mostrados). Este reclutamiento, sorprendentemente rápido, de linfocitos T en la piel después de escarificación cutánea con VV primaria no se había apreciado anteriormente.

Se realizaron diversos hallazgos adicionales imprevistos. A diferencia del tránsito tisular altamente específico 60 h después de la infección, las células OT-I activadas se habían diseminado en el NL no de drenaje 5 días después de escarificación cutánea con rVV-ova (Fig. 8a). Esto no estaba acompañado de diseminación sistémica de células presentadoras de antígeno (CPA) portadoras del antígeno VV o VV, dado que la expresión del gen de la vacuna no se detectó fuera de la piel o del NL de drenaje cutáneo mediante RT-PCR en tiempo real altamente sensible (Fig. 8b), y las CPA aisladas de NLM y de bazo no activaron a las células OT-I *in vitro* (Fig. 8c). Por lo tanto, un subconjunto de células OT-I ILN-activadas se diseminó a lo largo de los tejidos linfoides y continuó dividiéndose en ausencia de estimulación antigénica continuada. Inesperadamente, también expresan moléculas adicionales de retorno dirigido específicas de tejido. Como se observa en la Fig. 9a, la  $\alpha 4\beta 7$  de retorno dirigido al intestino, se reguló positivamente en las células OT-I proliferantes. Cuando se bloqueó la salida de las células OT-I del NLI después de su activación usando FTY720, un antagonista funcional de esfingosina 1-fosfato que regula la salida de linfocitos de los tejidos linfoides (Fig. 9b), la expresión de E-Lig en células OT-I no se vio afectada (Fig. 9c), sin embargo, la  $\alpha 4\beta 7$  se anuló en células OT-I (Fig. 9d). Estos datos sugieren contundentemente que la regulación positiva de moléculas de retorno dirigido al intestino se produce después de la migración de células OT-I al interior del NLM (impronta secundaria de retorno dirigido a tejido). Se cree que puede producirse un proceso similar en otro NL no de drenaje donde se expresan supuestas moléculas de tránsito pulmonares y mucosas. Cuando se examinaron linfocitos T 30 días después de infección, las moléculas de retorno dirigido tanto primarias (E-Lig específicas de piel) como secundarias ( $\alpha 4\beta 7$  específicas de intestino) persistieron en células OT-I de memoria (Fig. 10). En conjunto estos datos sugieren un mecanismo mediante el cual la inmunización con VV localizada mediante escarificación cutánea genera una respuesta de linfocitos T protectora para el control inmunitario inmediato específico de piel en el sitio de entrada del virus y una protección sistémica más flexible contra una posible diseminación viral o exposición secundaria en una localización anatómica distinta, tal como el epitelio respiratorio.

**Ejemplo 5: la escarificación cutánea con MVA representa una nueva estrategia de inmunización que es superior, inocua y eficaz.**

La cepa MVA del VV con replicación defectuosa altamente atenuado se exploró de manera activa como un vector de vacuna viral vivo prometedor debido a impresionante perfil de su seguridad e inmunogenicidad en estudios tanto clínicos como preclínicos. Las vacunas del MVA se han administrado exclusivamente mediante vías de inyección, y nunca mediante escarificación cutánea. Esto puede deberse a la suposición intuitiva de que la replicación viral en la epidermis es necesaria para el desarrollo de lesión por viruela y la posterior fuerte protección contra la exposición.

Sin embargo, se inmunizaron ratones con MVA mediante escarificación cutánea. Sorprendentemente, la escarificación cutánea con MVA indujo lesiones por viruela características de una manera dependiente de la dosis (Fig. 11a) y generó respuestas inmunitarias celulares y humorales dependientes de dosis contra antígenos VV (Fig. 11b, c). Cabe destacar que, cuando se exponen letalmente a infección WR-VV intranasal, la escarificación cutánea con MVA proporcionó una protección completa contra mortalidad y dolencia a  $1,8 \times 10^6$  ufp (Fig. 11d), a dosis a las que la inmunización con VV duplicativa mediante las vías de inyección convencionales no protegen a los ratones de exposición letal (Fig. 3a, b). No sorprendentemente, a una dosis comparable ( $2 \times 10^6$  ufp) de inmunización con MVA,



las vías de inyección convencionales solamente suscitaron respuestas de Ac y de linfocitos T débilmente detectables (Fig. 12a, b), incluso después de exposición viral secundaria (Fig. 12c, d), y ofrecieron mala protección contra la exposición i.n. a WR-VV (Fig. 12e, f), mientras que se obtuvo una fuerte inmunoprotección mediante escarificación cutánea con cualquiera de MVA o VV.

- 5 Por lo tanto, la inmunogenicidad y eficacia protectora superior asociada con la escarificación cutánea se amplía a la vacuna de MVA altamente atenuada.

- 10 La seguridad de la escarificación cutánea con MVA para huéspedes inmunocomprometidos se confirmó en ratones Rag-/- que carecían tanto de linfocitos T como B. Los ratones Rag-/- escarificados con MVA desarrollaron lesión por viruela que se confinó en el lugar de la inoculación (Fig. 13a) y sobrevivieron más tiempo sin perder ningún PC (Fig. 13b, c) o sin viremia detectable (Fig. 13d). En cambio, ratones Rag-/- escarificados con VV desarrollaron erosión dérmica y necrosis deteriorante y sucumbieron aproximadamente 4 semanas después de la infección (Fig. 13 a-c).

- 15 La observación de que la escarificación cutánea con MVA es muy eficaz generando inmunoprotección indica que para obtener una fuerte eficacia protectora no se requiere infección viral prolífica en la epidermis. Sin embargo, la infección de la epidermis con virus vivos metabólicamente activos, parece ser necesaria para desarrollar una respuesta inmunitaria rigurosa. Esto se sugirió, en primer lugar, por la incapacidad del VV termoinactivado de inducir una fuerte respuesta inmunitaria cuando se administraba mediante escarificación cutánea incluso a una dosis elevada; en segundo lugar, por no poder realizar la “escarificación” cutánea simultánea con solución salina para potenciar las respuestas inmunitarias en ratones infectados con VV mediante inyección (datos no mostrados). Los aspectos exclusivos de respuestas cutáneas innatas contra infección por VV en la epidermis pueden servir como un adyuvante natural para optimizar la respuesta adaptativa posterior. Respaldando esta idea, se encontró que los queratinocitos humanos primarios, aunque no los fibroblastos dérmicos ni las células endoteliales microvasculares dérmicas, podían limitar la replicación *in vitro* del VV en ausencia de respuestas inmunoadaptativas del huésped. Además, la sobreexpresión transgénica de la citocina IL-1 $\alpha$  innata en queratinocitos conducía a un potenciamiento adicional de respuestas inmunoadaptativas *in vivo* después de escarificación cutánea con VV.

- 25 En resumen, estas observaciones demuestran que la vía de inmunización es una cuestión importante para el diseño de estrategias de vacunación. La inmunización epidérmica con vacunas virales vivas, incluyendo los virus no replicantes, genera respuestas inmunitarias mucho mejores y protección más fuerte en comparación con las vías de inyección rutinariamente usadas en los centros médicos, particularmente en lo que respecta al MVA.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un poxvirus vivo, modificado, no replicante, que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno peptídico o polipeptídico que es exógeno al poxvirus, en el que el poxvirus infecta células humanas, pero no se replica en ellas; para su uso en un procedimiento para suscitar una respuesta inmunitaria de linfocitos T de memoria en el antígeno exógeno, administrando el poxvirus a una epidermis mecánicamente alterada de un sujeto, de tal manera que el poxvirus que expresa el antígeno exógeno infecta la epidermis alterada y suscita una respuesta inmunitaria de linfocitos T de memoria.
2. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que el poxvirus se selecciona del grupo que consiste en: orthopoxvirus, suipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, parapoxvirus, molluscipoxvirus y yatapoxvirus.
- 10 3. El poxvirus para su uso según la reivindicación 2, en el que el virus orthopoxvirus es un virus de la vacuna.
4. El poxvirus para su uso según la reivindicación 3, en el que el virus de la vacuna es el virus de la vacuna Ankara (MVA) modificado.
5. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que la epidermis se altera mecánicamente mediante una aguja de escarificación, una aguja hipodérmica o un abrasivo.
- 15 6. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que la epidermis se altera mecánicamente al mismo tiempo o antes de la administración del poxvirus.
7. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene o corre el riesgo de desarrollar cáncer.
8. El poxvirus para su uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer de piel, de mama, de próstata, de pulmón, de cerebro, de ovario, de hígado, de páncreas, de estómago, de hígado, de vejiga y de tiroides o cáncer colorrectal.
- 20 9. El poxvirus para su uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, carcinoma de células escamosas cutáneas, carcinoma de células basales, carcinoma de células de Merkel, carcinoma adnexal, linfoma de linfocitos T o B cutáneos, sarcomas, adenocarcinoma, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, cáncer de ovario de origen epitelial, adenocarcinoma y leiomioma colorrectal, adenocarcinoma y leiomioma de estómago, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, adenocarcinomas ductales de páncreas, tumores pancreáticos endocrinos, carcinoma de células renales, carcinoma de células transicionales de riñón y vejiga y carcinoma de células escamosas de vejiga.
- 25 10. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene o corre el riesgo de desarrollar una infección viral, bacteriana, fúngica o protozoaria.
- 30 11. El poxvirus para su uso según la reivindicación 10, en el que si la infección es una infección viral, la infección está causada por: el VIH, el virus de la gripe, el virus del dengue, el virus de la Hepatitis A, el virus de la Hepatitis B, el virus de la Hepatitis C, el papilomavirus humano, el virus del Ébola, el virus de Marburg, el virus de la Rabia, el infección por virus de Hanta, el virus del Nilo Occidental, los Coronavirus de tipo SARS, el virus del Herpes simple, virus de Varicela zóster, virus de Epstein-Barr, el herpesvirus Humano 8, los afavirus o la encefalitis de St. Louis; en el que si la infección es una infección bacteriana, la infección está causada por *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Rickettsia typhi* o *Treponema pallidum*;
- 35 en el que si la infección es una infección fúngica, la infección está causada por *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* o especies de *Aspergillus*;
- 40 en el que si la infección es una infección protozoaria, la infección está causada por Malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), una especie de *Leishmania*, una especie de *Trypanosoma* (africano y americana), un *cryptosporidium*, una especie de Isospora, *Naegleria fowleri*, una especie de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Toxoplasma gondii* o *Pneumocystis carinii*.
- 45 12. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor (AAT), un antígeno específico de tumor (AET) o un antígeno específico de tejido.
13. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que el antígeno es un antígeno viral, bacteriano, fúngico o protozoario.
- 50 14. El poxvirus para su uso según la reivindicación 1, en el que una molécula coestimuladora, un factor de crecimiento, un adyuvante y/o una citocina se coadministra antes, al mismo tiempo o después del antígeno y en un mismo sitio o en un sitio diferente.
15. El poxvirus para su uso según la reivindicación 14, en el que la molécula coestimuladora o la citocina se coexpresa con el antígeno mediante el poxvirus.

16. El poxvirus para su uso según la reivindicación 14 o 15, en el que la molécula coestimuladora coexpresada se selecciona del grupo que consiste en: IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27, B7-2, B7-H3, CD40, CD40L, el ligando ICOS, OX-40L, 4-1BBL, GM-CSF, SCF, FGF, el ligando Flt3 y
  17. El poxvirus para su uso según la reivindicación 14 o 15, en el que el poxvirus expresa B7-1, ICAM-1 y LFA-3.
- 5 18. Un kit que comprende un dispositivo para alterar mecánicamente el tejido epidérmico de un sujeto, tal como una aguja de escarificación o un abrasivo, y el poxvirus para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17.

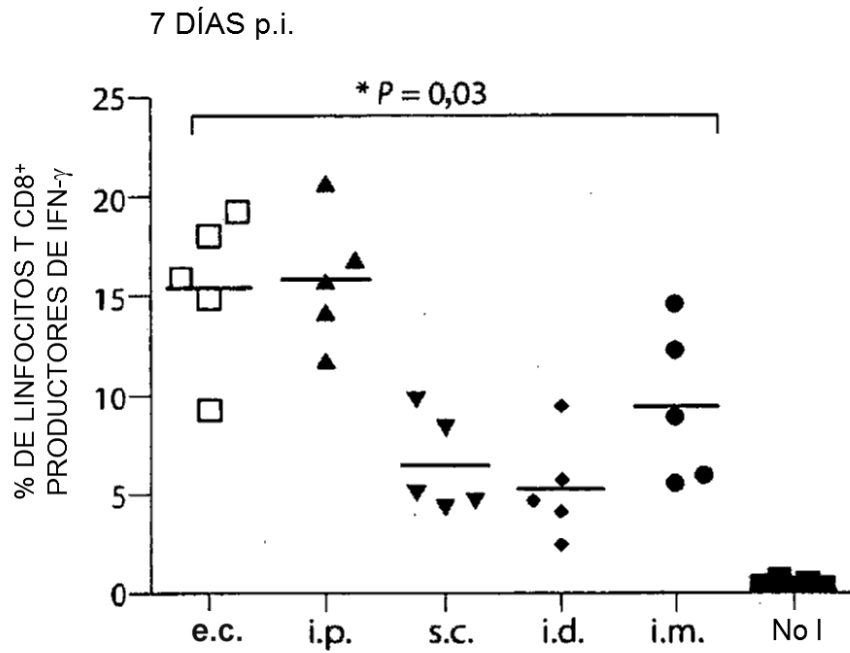


Fig. 1A

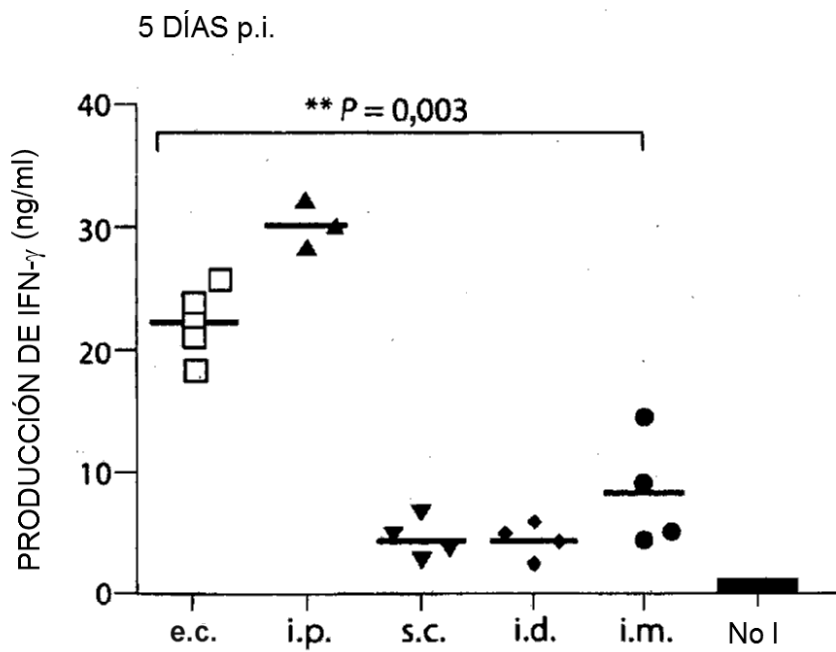


Fig. 1B

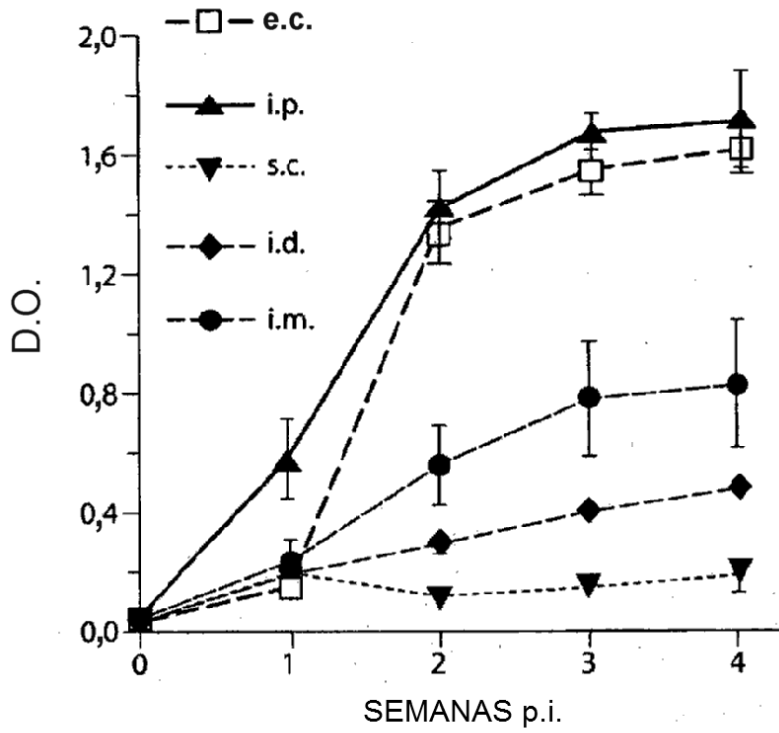


Fig. 1C

11 SEMANAS p.i.

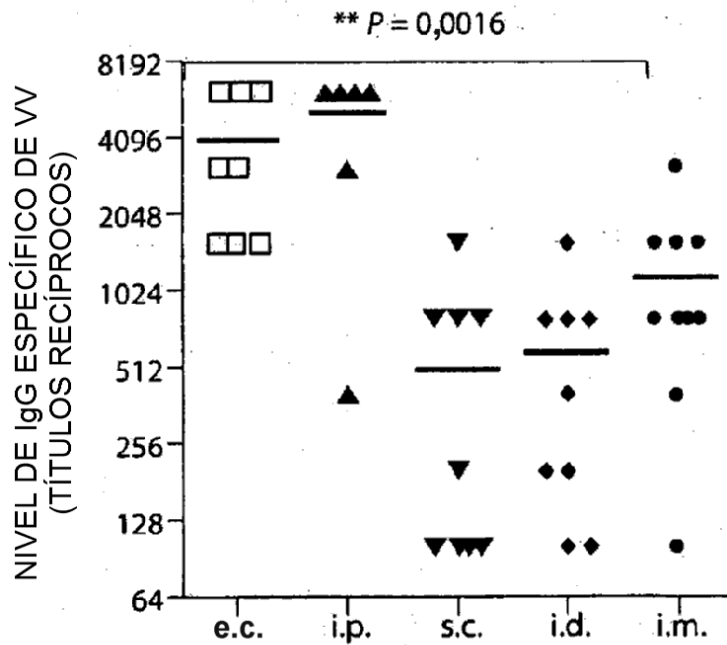


Fig. 1D

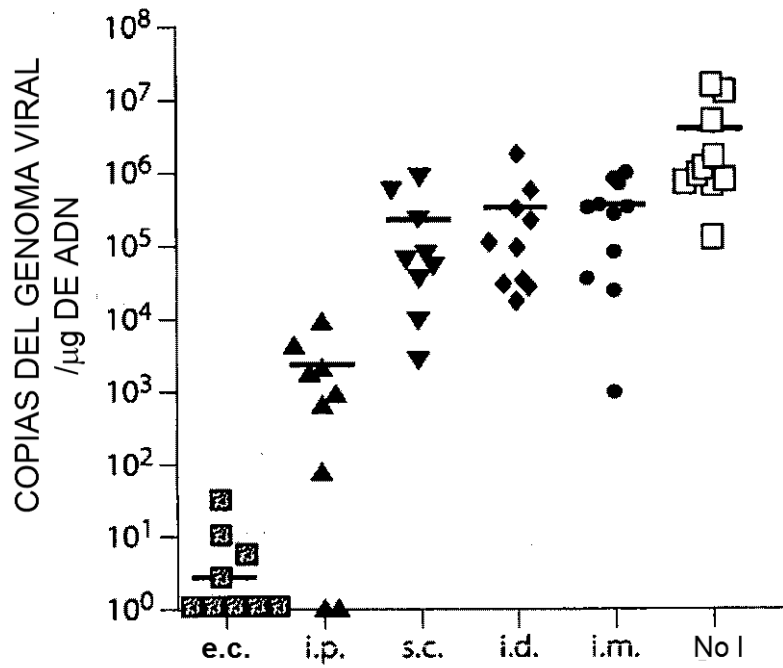


Fig. 2

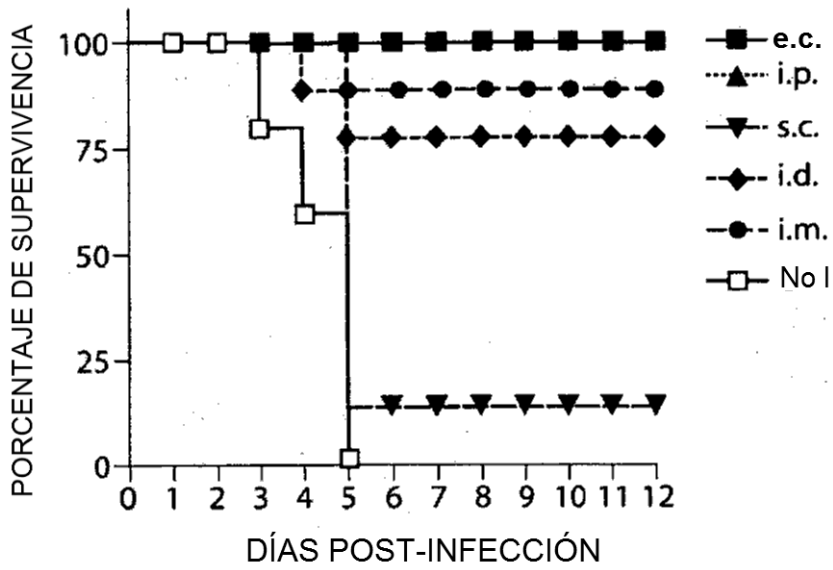


Fig. 3A

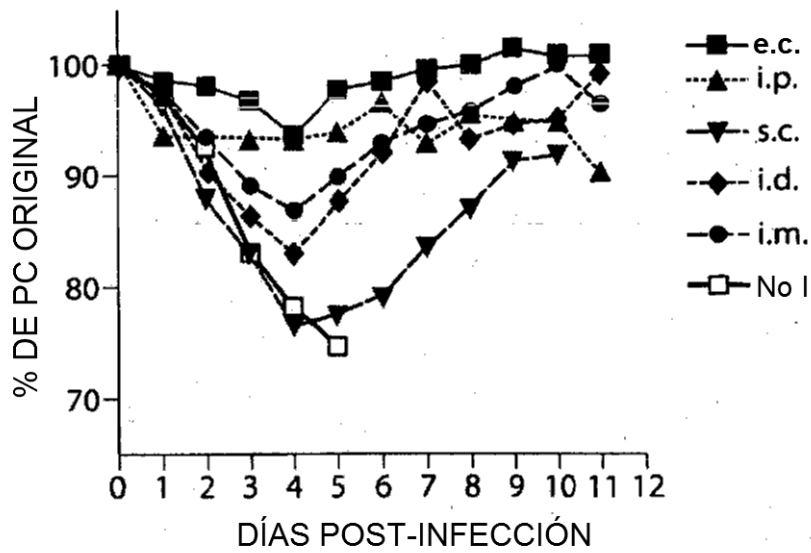


Fig. 3B

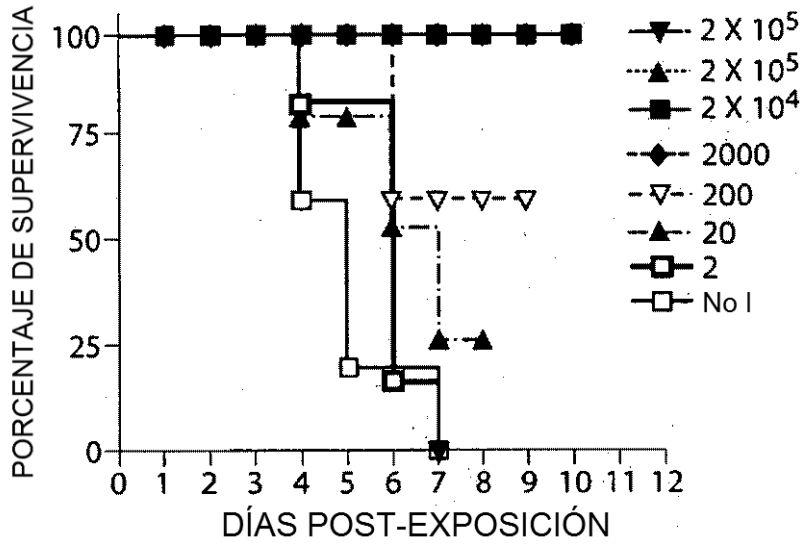


Fig. 3C

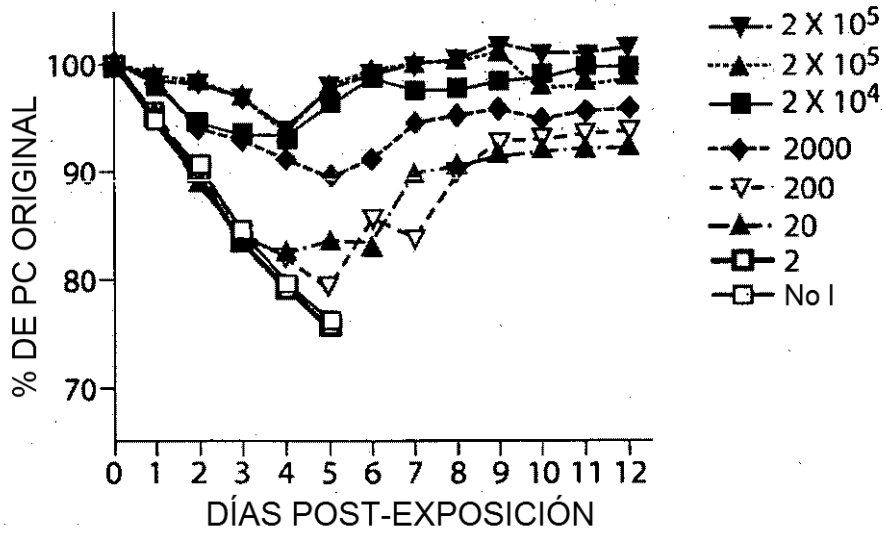


Fig. 3D



e.c.

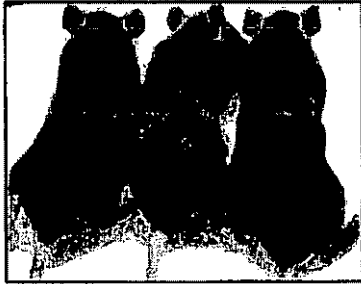


Fig. 4A

intradérmica

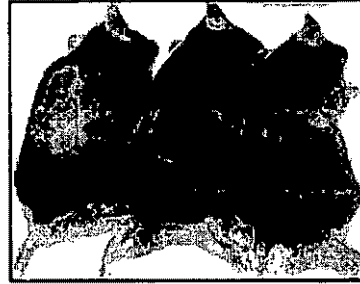


Fig. 4B

intramuscular

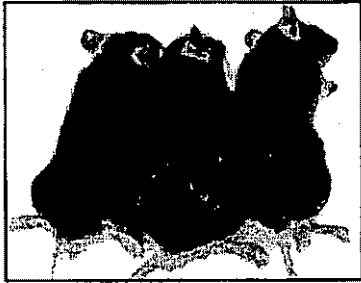


Fig. 4C

intraperitoneal

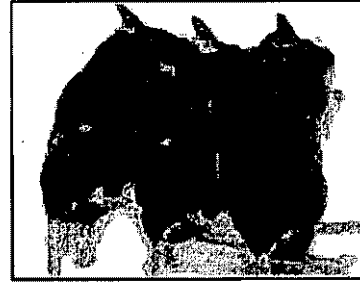


Fig. 4D

escarificación cutánea



Fig. 4E

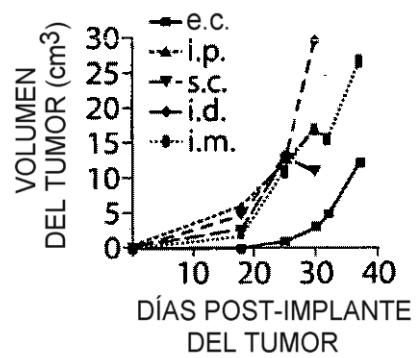


Fig. 4F

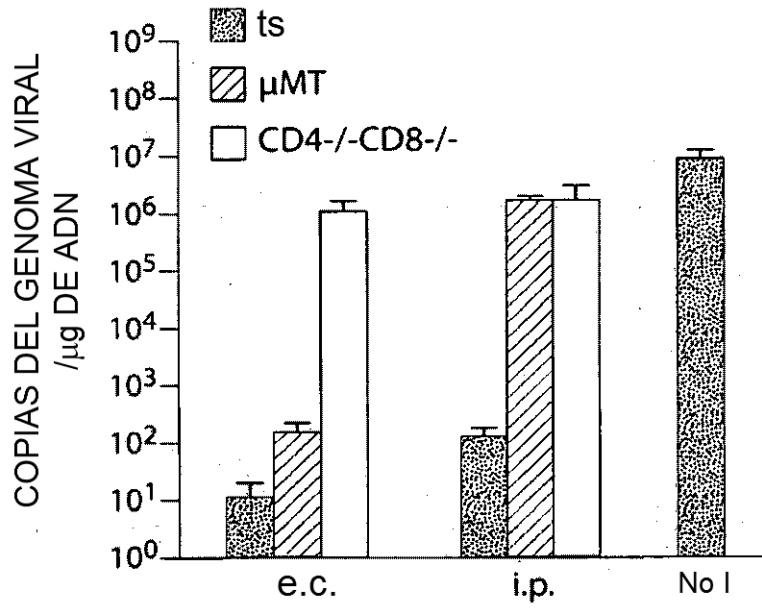


Fig. 5A

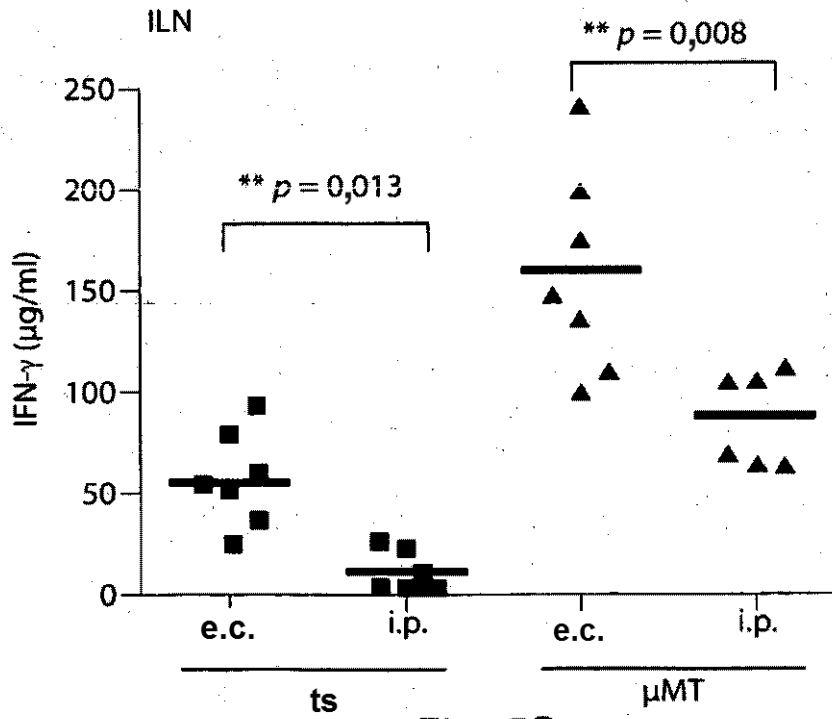


Fig. 5B

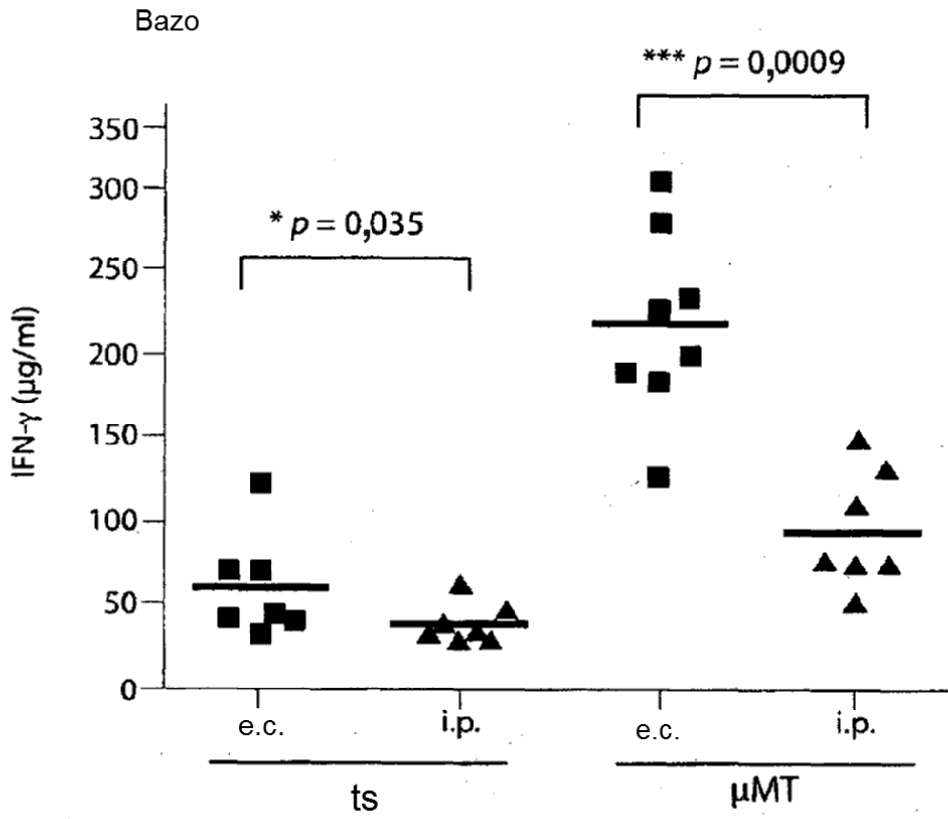


Fig. 5C

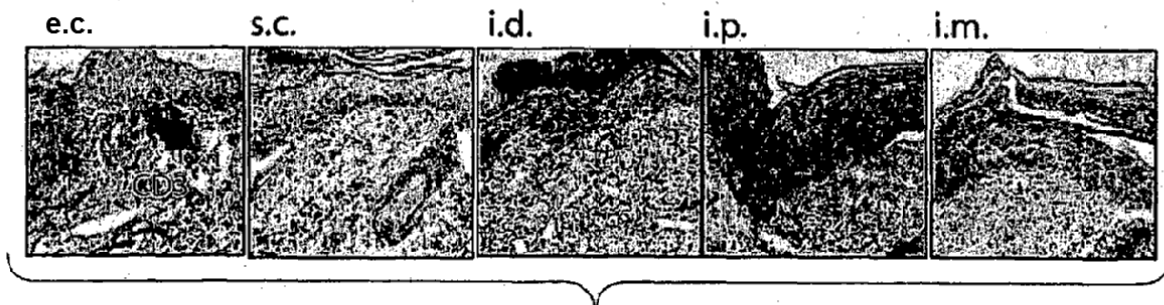


Fig. 5D

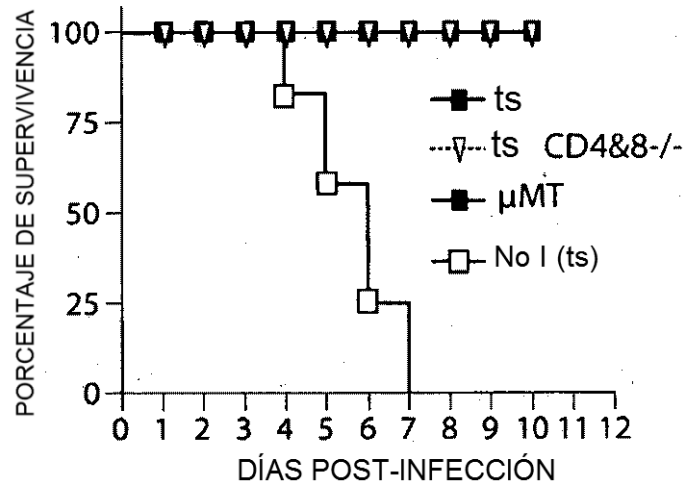


Fig. 6A

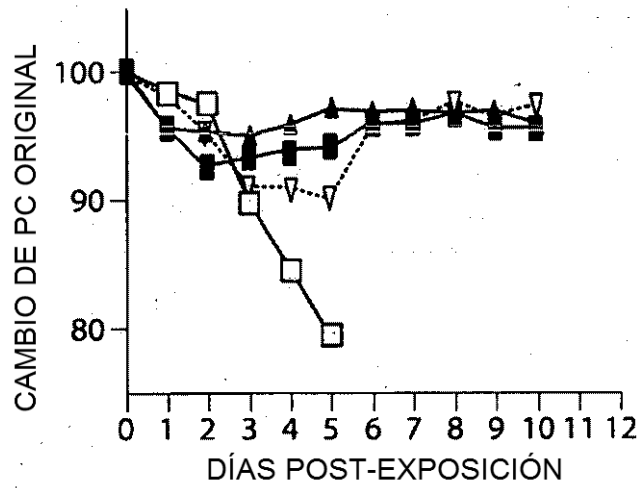


Fig. 6B

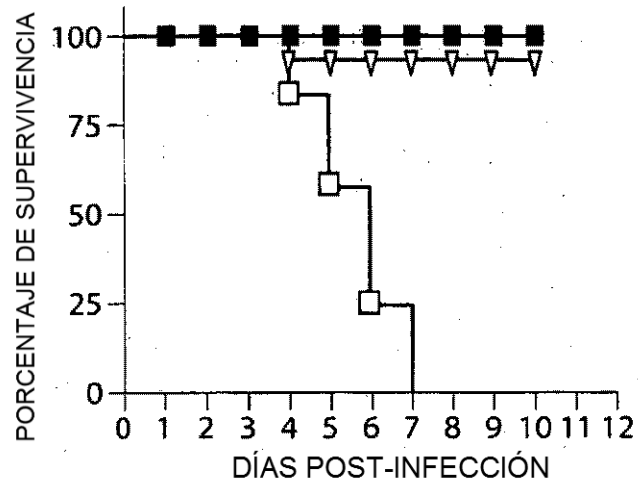


Fig. 6C

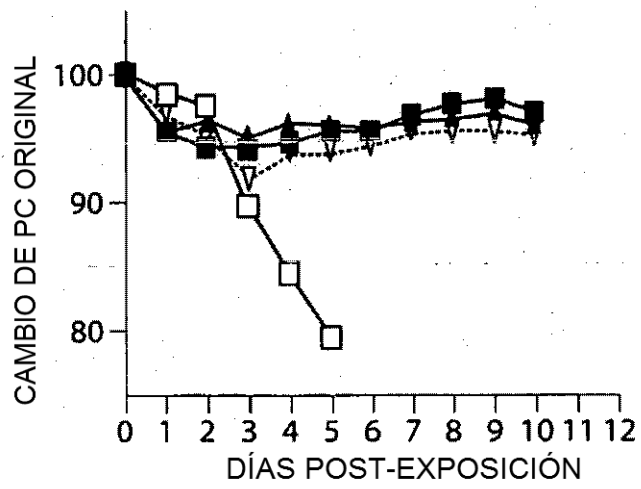


Fig. 6D

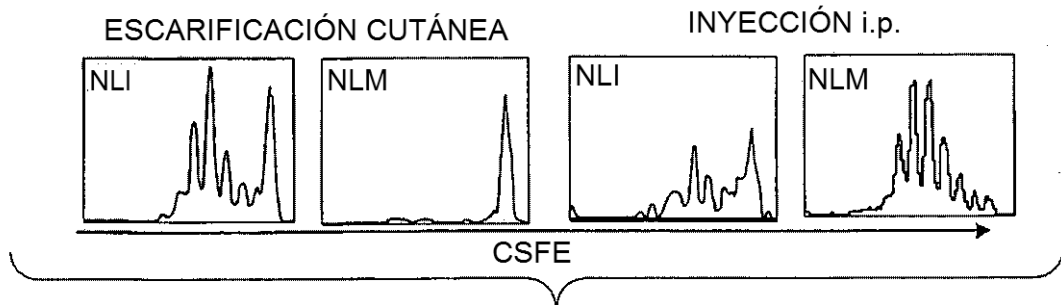


Fig. 7A

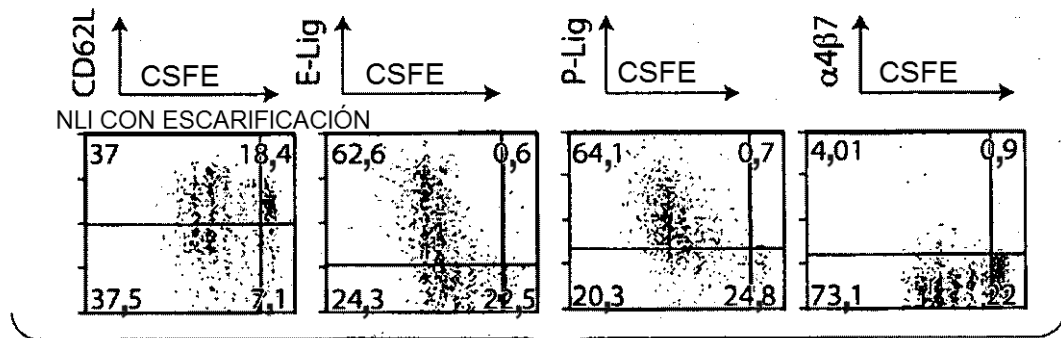


Fig. 7B

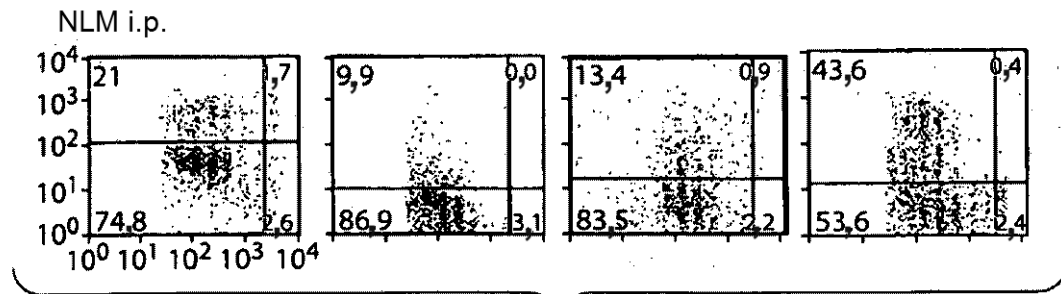


Fig. 7C

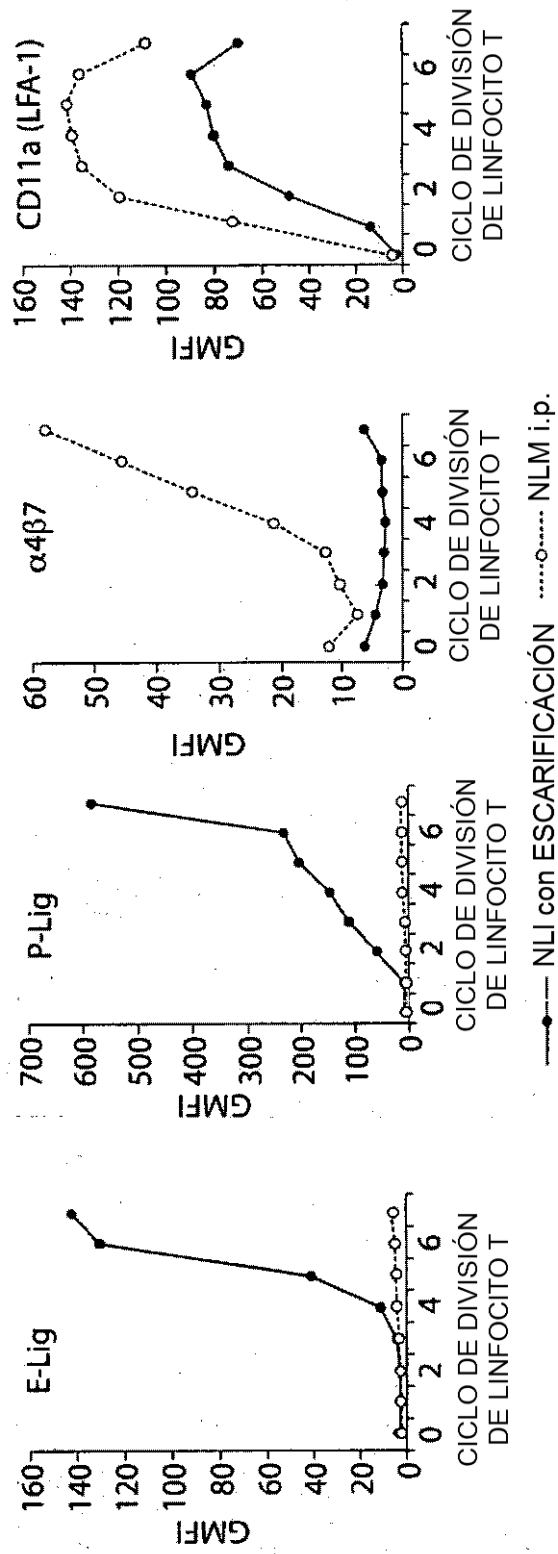


Fig. 7D

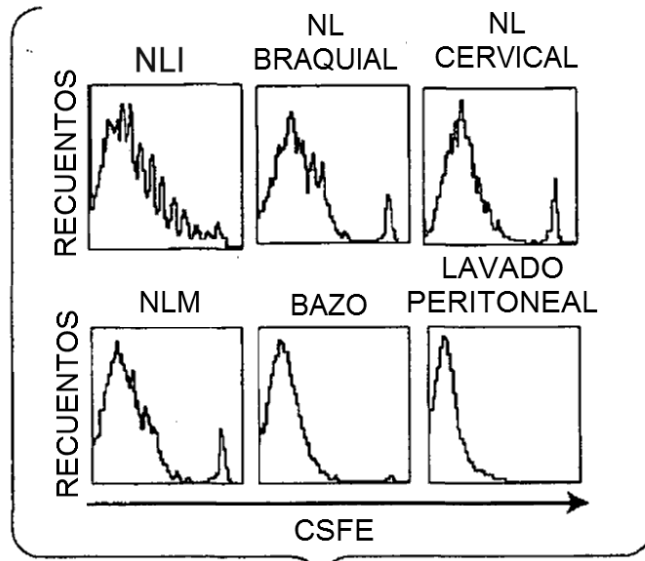


Fig. 8A

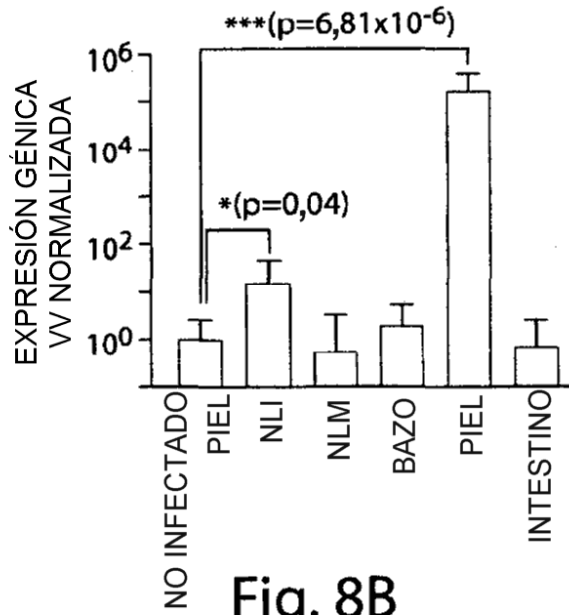


Fig. 8B

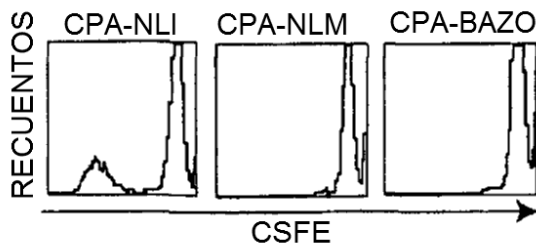


Fig. 8C



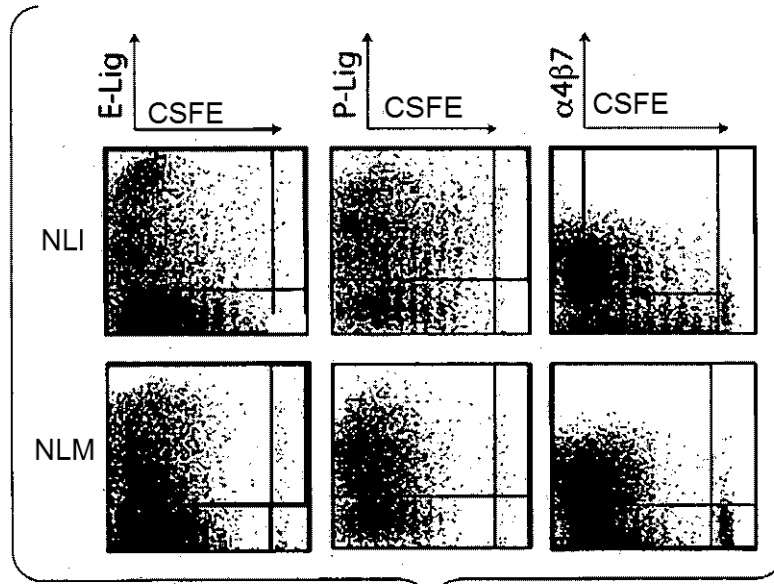


Fig. 9A

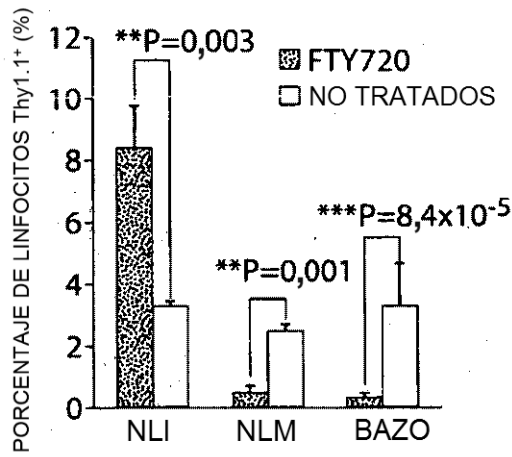


Fig. 9B

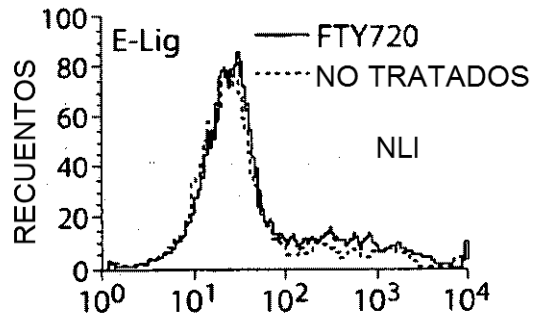


Fig. 9C

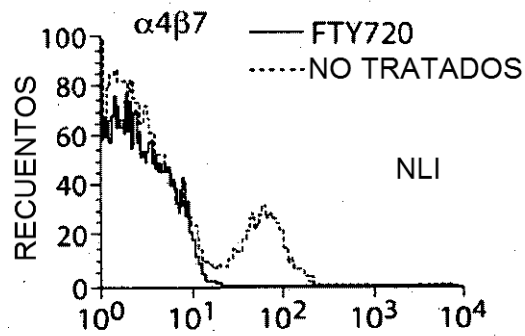


Fig. 9D

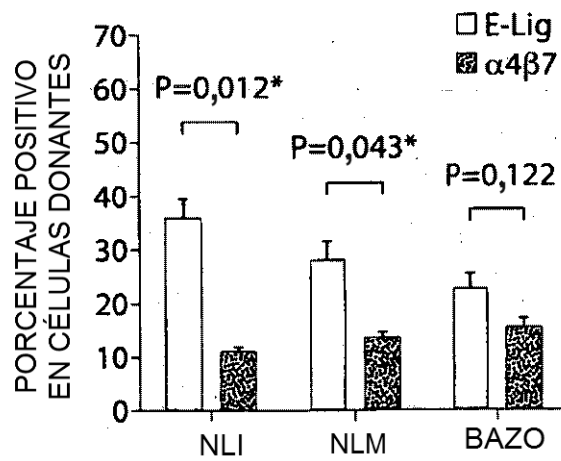


Fig. 10



Fig. 11A

RESPUESTA DE LINFOCITOS T (DÍA 7)

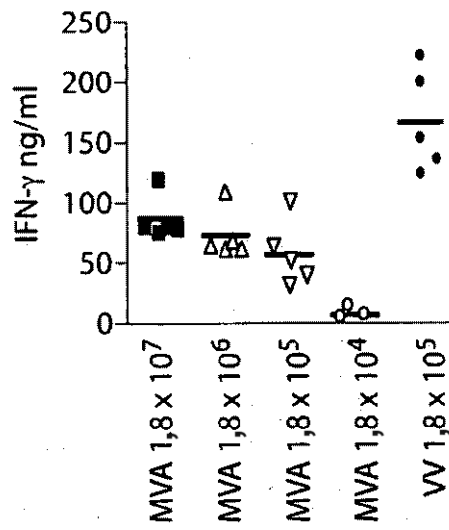


Fig. 11B

IgG ESPECÍFICA DE VV (6 SEMANAS)

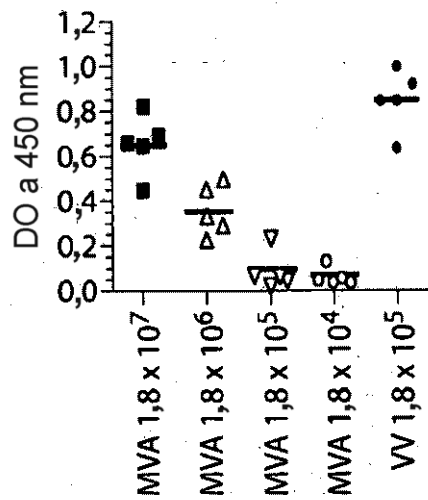


Fig. 11C

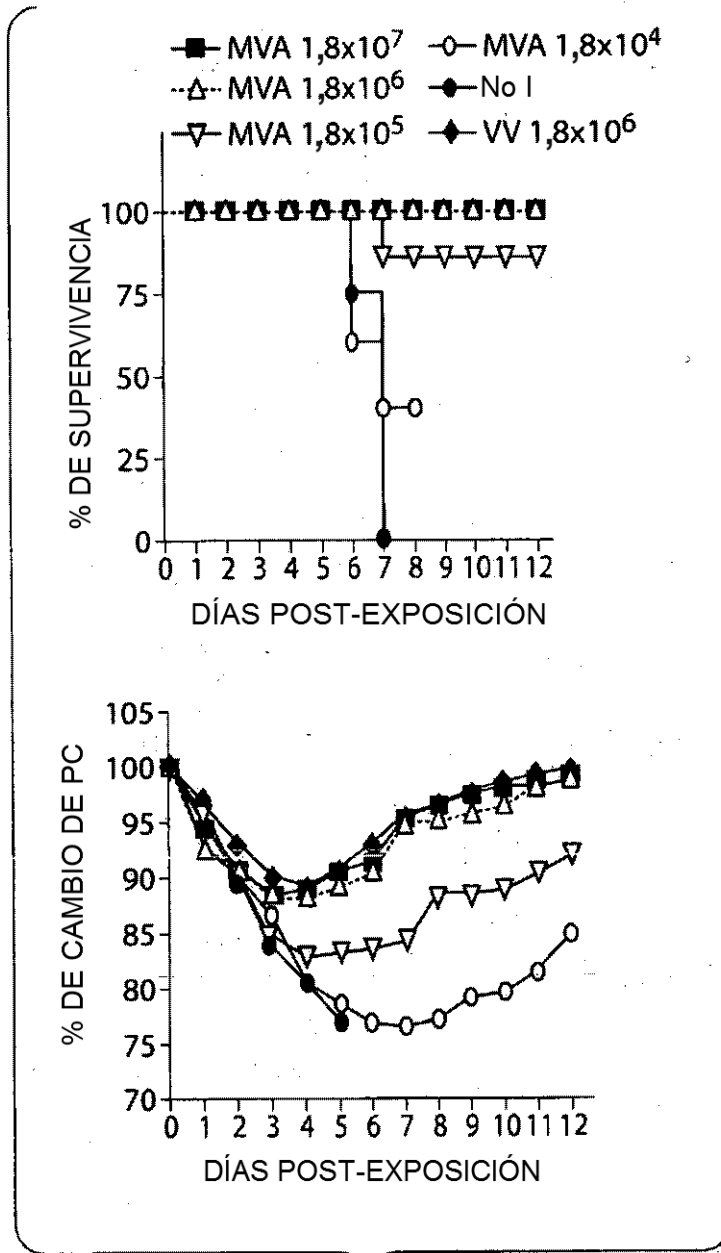


Fig. 11D

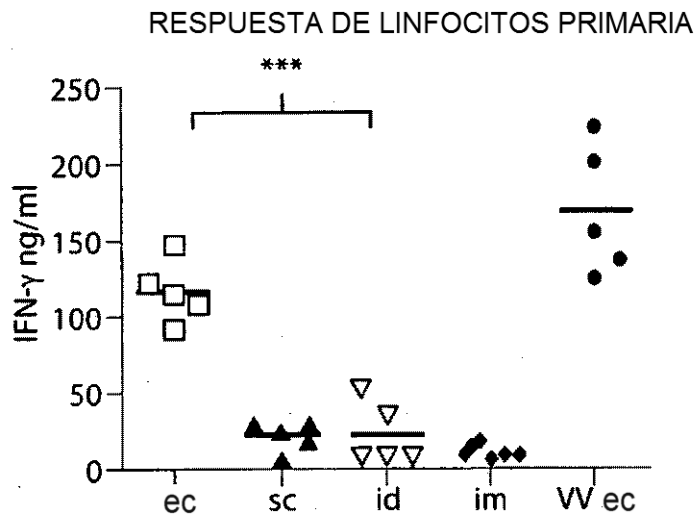


Fig. 12A

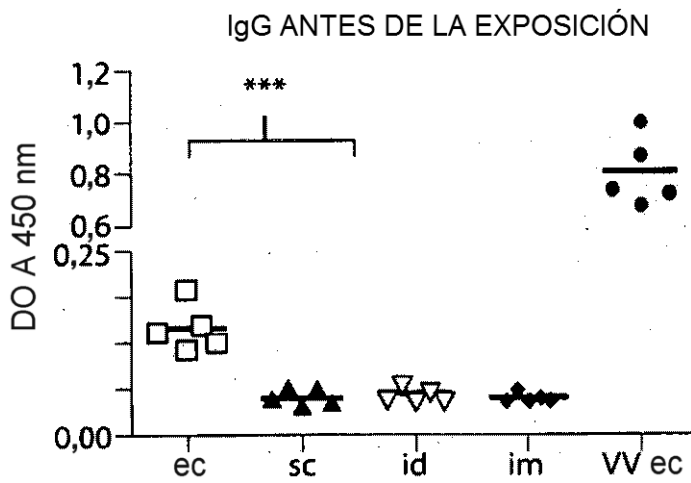


Fig. 12B

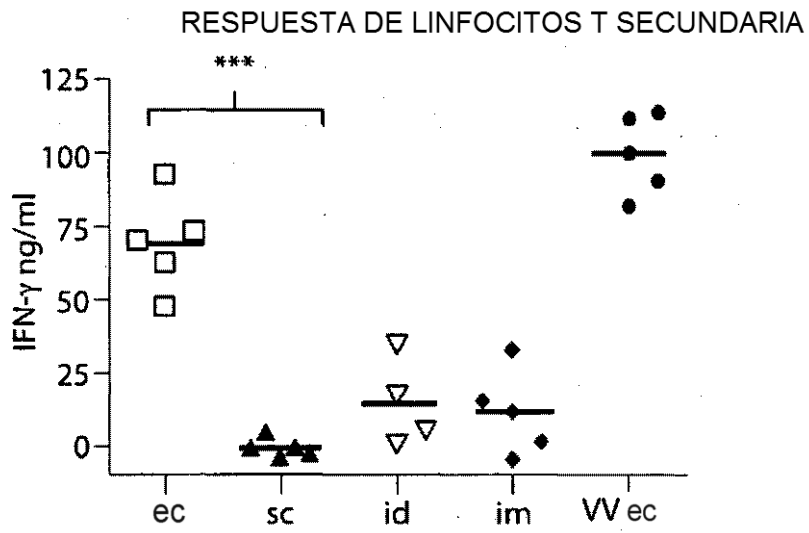


Fig. 12C

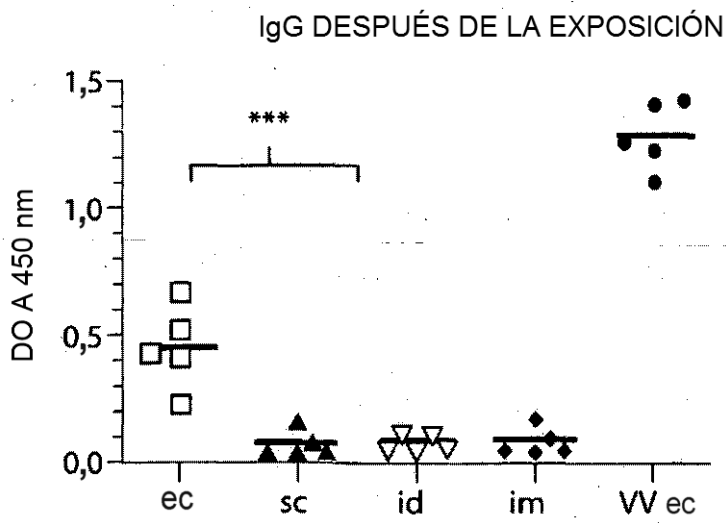


Fig. 12D

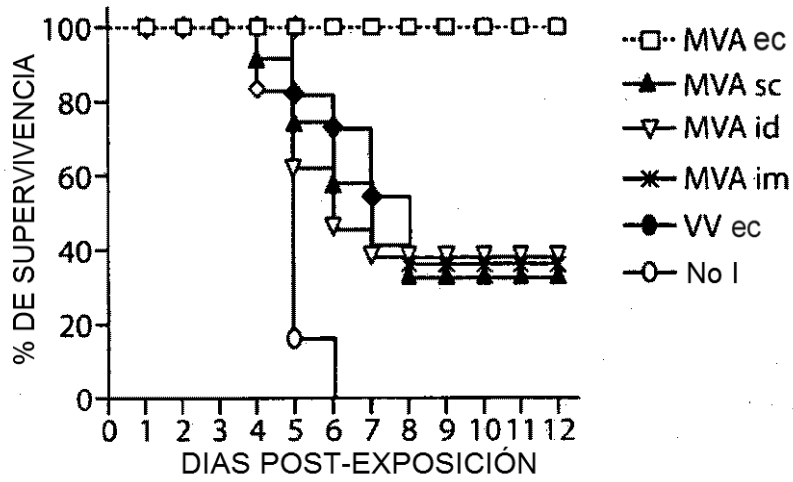


Fig. 12E

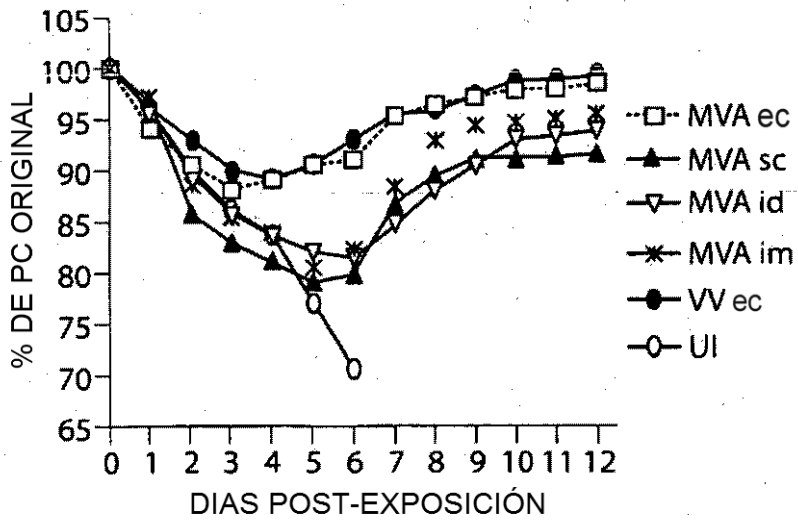


Fig. 12F

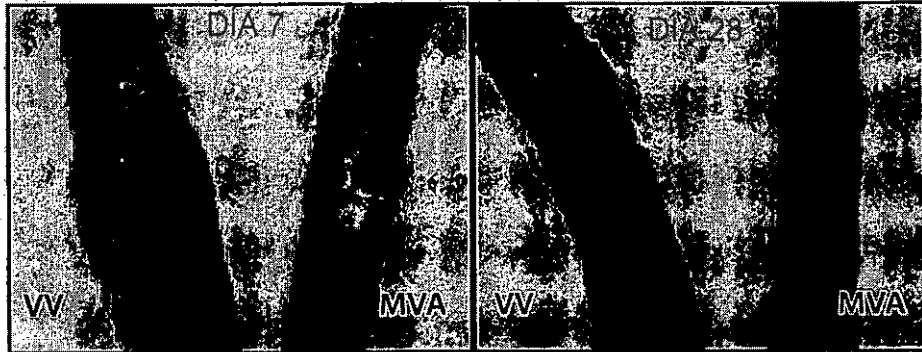


Fig. 13A



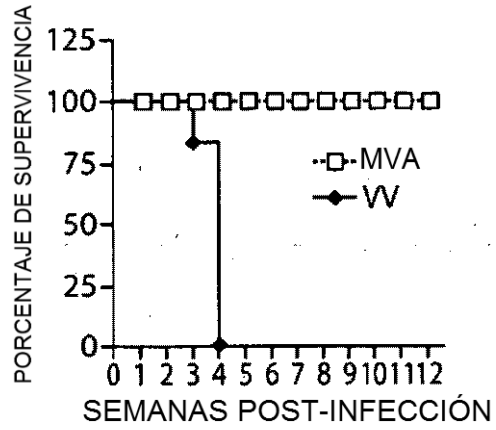


Fig. 13B

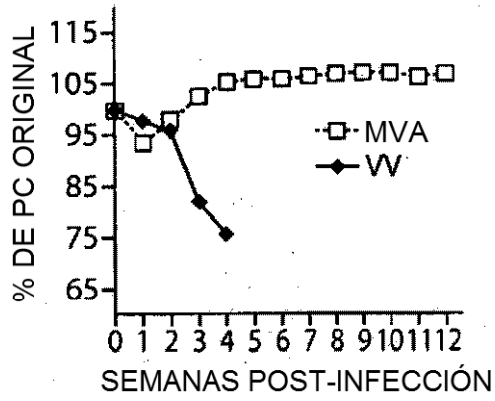


Fig. 13C

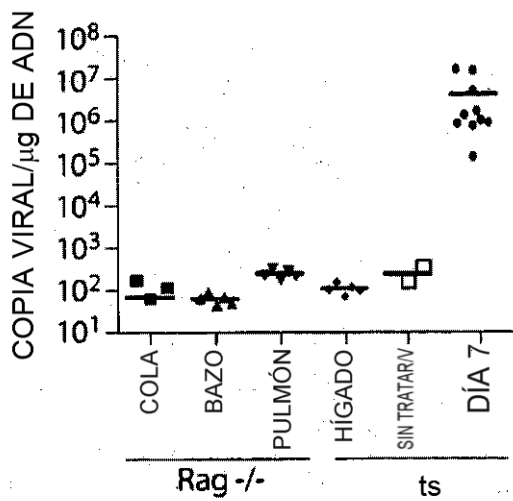


Fig. 13D