

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 175**

51 Int. Cl.:

A61K 39/285 (2006.01)

C07K 14/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08749145 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2152305**

54 Título: **Protección inmediata contra patógenos vía MVA**

30 Prioridad:

27.04.2007 US 924048 P

06.09.2007 US 935920 P

06.02.2008 US 26612

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

13.01.2016

73 Titular/es:

BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)

HEJRESKOVVEJ 10 A

3490 KVISTGAARD, DK

72 Inventor/es:

HOCHREIN, HUBERTUS y

O'KEEFFE, MEREDITH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 556 175 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

Protección inmediata contra patógenos vía MVA.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a virus vaccinia Ankara modificado (MVA, por sus siglas en inglés) para uso en proporcionar protección inmediata contra patógenos.

Antecedentes de la invención

10 Los poxvirus, incluyendo el agente causante de viruela; virus Variola (VARV), son virus ADN de doble cadena (ds, por sus siglas en inglés) altamente patógenos. Se estima que la viruela ha causado más de 300 millones de muertes en el siglo 20 sólo. A pesar de que los programas de vacunación tradicionales han erradicado VARV como un patógeno natural, queda mejorar el conocimiento de los mecanismos de sus infecciones y/o la protección puede ser esencial dadas las posibilidades de infecciones por poxvirus zoonóticas (por ejemplo, viruela del simio), la reaparición de VARV por liberación accidental o la posibilidad de ataques terroristas con poxvirus.

15 El género *Orthopoxvirus* contiene diversos virus relacionados basados en la similitud genérica y la reactividad cruzada inmunológica, incluyendo VARV, el agente causante de viruela humana, virus ectromelia (ECTV) causante de viruela del ratón, virus de la viruela de los vacunos (CPXV), virus de la viruela de los simios (MPXV), virus de la viruela de los camélidos (CMPV) y virus vaccinia (VACV). Entre estos se usan ECTV, MPXV y VACV en animales como infecciones modelo para viruela humana. Se ha usado una serie de cepas de VACV en ratones y se han elucidado grandes cantidades de evidencias sobre las respuestas inmunitarias inducidas y sobre los mecanismos de inmunosupresión empleados por los poxvirus con VACV. Sin embargo, VACV no es un patógeno natural de los ratones y se requieren altas dosis para infectar de manera letal a los ratones, a pesar de que se usan comúnmente cepas adaptadas a los ratones como Western Reserve (WR) de VACV (Williamson et al., J. Gen. Virol. 71: 2.761-2.767 (1.990)). El MPXV en simios presenta la ventaja de que los simios están mucho más próximos evolutivamente a los seres humanos. Sin embargo, como con el modelo de VACV en ratones, se requieren dosis víricas altas no fisiológicas para infectar de manera letal a los simios. Por lo tanto, se considera que ambos modelos de animales reflejan más la fase tardía de una infección por VARV en seres humanos (Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., y Ladnyi, I. D. Smallpox and its eradication. Geneva: Organización Mundial de la Salud (1.988); Mortimer, P. P. Clin. Infect. Dis. 36, 622-629 (2.003)). Entre los modelos de infección por orthopoxvirus, destaca la infección por ECTV de los ratones debido a que es un virus específico de la especie que infecta a su huésped natural y puede causar resultados fatales después de inoculación con dosis bajas de virus, características que también se han descrito en infección por VARV de seres humanos (Fenner et al., 1.988; Esteban, D. J., y Buller, R. M., J. Gen. Virol. 86: 2.645-2.659 (2.005)). Por estas razones, este modelo es el modelo más próximo a infección humana por VARV.

20 Se han detectado patógenos por el sistema inmunitario por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés). Entre los últimos está la familia de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés). TLR7 y TLR8 y 9 reconocen el ARN y ADN de los ácidos nucleicos, respectivamente, (Hemmi, H. et al., Nature 408, 740-745 (2.000); Diebold, S. S. et al. Science 303, 1.529-1.531 (2.004); Heil, F. Science 303, 1.526-1.529 (2.004)). Los virus ADN de doble cadena (ADNs), como herpesvirus o adenovirus, se pueden detectar por rutas dependientes de TLR9 (Basner-Tschakarjan, E. et al., J. Gene Med. 8, 1.300-1.306 (2.006); Lund, J. et al., J. Exp. Med. 198, 513-520 (2.003); Krug, A. et al. Blood 103, 1.433-1.437 (2.004); Hochrein, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 101, 11.416-11.421 (2.004); Tabeta, K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 3.516-3.521 (2.004)). Sin embargo, existan rutas de reconocimiento alternativas potentes, que explican posiblemente por qué los estudios de infección vírica previos no han demostrado o sólo han demostrado aumentos leves de la susceptibilidad en ausencia de TLR9 (Hochrein, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 11.416-11.421 (2.004); Krug, A et al. Blood 103, 1.433-1.437 (2.004); Zhu, J. et al. Blood 109, 619-625 (2.007); Delale, T. J Immunol. 175, 6.723-6.732 (2.005); Tabeta, K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 3.516-3.521 (2.004)).

25 Mientras muchos TLR se sitúan en la membrana más externa de la célula para controlar el espacio extracelular para señales de peligro como componentes de la pared celular bacteriana, un grupo de TLR que consiste en TLR 3, 7, 8 y 9 se asocia al endosoma y controla el lumen endosómico para ácidos nucleicos (Wagner, H., y Bauer, S., J. Exp. Med. 203: 265-268 (2.006)). El TLR 3, 7, y 8 reconocen ARN, mientras TLR9 reconoce ADN (Diebold et al., Science 303: 1.529-153 (2.004); Heil et al., Science 303: 1.526-1.529 (2.004); Hemmi et al., Nature 408: 740-745 (2.000); Alexopoulou et al., Nature 413: 732-738 (2.001)).

30 La expresión de TLR9 difiere dentro de la especie. Mientras en las células B humanas y DC plasmacitoides (pDC), pero no DC convencionales (cDC), se expresa y responde a estimulación por TLR9, la expresión de TLR9 en ratones está menos restringida. Además de las células B y pDC, se sabe que las cDC de ratón e incluso los macrófagos expresan TLR9 y responden a ligadura de TLR9 (Hochrein et al., Hum. Immunol. 63: 1.103-1.110 (2.002)). El ligando natural para TLR9 fue definido originalmente que era ADN bacteriano genómico, mientras los oligonucleótidos que contenían motivos CpG no metilados colindados por motivos específicos de la especie y con frecuencia estabilizados con fosforotioato (CpG-ODN), se establecieron como ligandos artificiales para TLR9 (Hemmi et al., 2.000; Bauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98: 9.237-9.242 (2.001)).

Mientras tanto, la lista de CpG que contiene ligandos naturales y artificiales ha aumentado para ADN plásmido bacteriano y diversos tipos de CpG-ODN con diferencias en su composición química, así como diferencias drásticas en efectos biológicos incluyendo capacidad inductora de IFN-I (Spies et al., J. Immunol. 171: 5.908-5.912 (2.003); Krieg, A. M. Nat. Rev. Drug Discov. 5: 471-484 (2.006)). En las condiciones de absorción aumentada, también se ha mostrado que el ADN que no contiene CpG o completamente metilado así como ADN vertebrado actúan como agonistas de TLR9 (Yasuda et al., J. Immunol. 174: 6.129-6.136 (2.005); Means et al., J. Clin. Invest 115: 407-417 (2.005)).

Los poxvirus han desarrollado múltiples estrategias para supresión inmunológica, sustanciadas por el hecho de que los genomas de los poxvirus codifican numerosas moléculas con función inmunosupresora. Entre éstas están los receptores de citocinas y quimiocinas solubles y una multitud de moléculas que interfieren con cascadas de señalización celular (Seet, B. T. et al. Annu. Rev. Immunol. 21, 377-423 (2.003)). Recientemente, las moléculas expresadas por poxvirus han demostrado que fijan como objetivo miembros de la cascada de señalización de TLR, que sugiere una función para rutas de reconocimiento dependientes de TLR (Bowie, A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 10.162-10.167 (2.000)). De hecho, se propuso una función para TLR2 en el reconocimiento de virus vaccinia (VACV) (Zhu, J. et al. Blood 109, 619-625 (2.007)).

El virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) se relaciona con el virus Vaccinia, un miembro del género Orthopoxvirus en la familia de Poxviridae. Se ha generado MVA por 516 pases seriados en fibroblastos de embrión de pollo de la cepa Ankara del virus vaccinia (CVA) (para revisión véase Mayr, A., et al. Infection 3, 6-14 (1.975)). Como consecuencia de estos pases a largo plazo, el virus MVA resultante suprimió aproximadamente 31 kilobases de su secuencia genómica y, por lo tanto, se describió como célula huésped altamente restringida a células aviares (Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1.031-1.038 (1.991)). Se mostró, en una variedad de modelos de animales, que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. y Danner, K. Dev. Biol. Stand. 41: 225-34 (1.978)). Adicionalmente, esta cepa de MVA se ha ensayado en pruebas clínicas como vacuna para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana (Mayr et al., Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B 167, 375-390 (1.987), Stickl et al., Dtsch. Med. Wschr 99, 2.386-2.392 (1.974)). Estos estudios implicaron más de 120.000 seres humanos, incluyendo pacientes de alto riesgo y se demostró que, comparado con vacunas a base de Vaccinia, MVA había disminuido la virulencia o la infectividad mientras se mantenía buena inmunogenicidad. En las décadas que siguieron, se ha logrado usar MVA como vector vírico para expresión de genes recombinantes y como una vacuna recombinante (Suttee G. et al., Vaccine 12: 1.032-40 (1.994)).

Con respecto a esto, lo más sorprendente es que, a pesar de que Mayr et al. demostraron durante los años 70 que MVA está altamente atenuado y es avirulento en seres humanos y en mamíferos, algunas observaciones indicadas recientemente (Blanchard et al. J. Gen. Virol. 79, 1.159-1.167 (1.998); Carroll y Moss, Virology 238, 198-211 (1.997); Patente de EE.UU. 5.185.146; Ambrosini et al., J. Neurosci. Res. 55 (5), 569 (1.999)) han demostrado que MVA no está totalmente atenuado en estirpes celulares de mamíferos y seres humanos puesto que podía ocurrir replicación residual en estas células. Se asume que los resultados indicados en estas publicaciones se han obtenido con diversas cepas de MVA, puesto que los virus usados difieren esencialmente en sus propiedades, en particular en su comportamiento de crecimiento en diversas estirpes celulares.

Se reconoce comportamiento de crecimiento como uno de diversos indicadores para atenuación de virus. En general, se considera una cepa de virus como atenuada si ha perdido su capacidad o sólo presenta capacidad reducida para replicarse de manera reproductiva en células huésped. La observación ya mencionada, que MVA no es completamente replicación incompetente en células de seres humanos y de mamíferos, cuestiona la absoluta seguridad de MVA como una vacuna humana o un vector para vacunas recombinantes.

En particular, para una vacuna así como para una vacuna recombinante, el equilibrio entre la eficacia y la seguridad del virus del vector vaccinia son extremadamente importantes.

Como se describe en la publicación de patente internacional WO 02/42480, se han desarrollado nuevas cepas de MVA con seguridad mejorada. Estas cepas se caracterizan por tener al menos una de las siguientes propiedades ventajosas:

(i) capacidad de replicación reproductiva *in vitro* en fibroblastos de embrión de pollo (CEF, por sus siglas en inglés), pero no capacidad de replicación reproductiva en una estirpe celular humana, como en la estirpe celular de queratinocitos humana HaCaT, la estirpe celular 293 de riñón de embrión humano, la estirpe celular 143B de osteosarcoma óseo humano y la estirpe celular de adenocarcinoma de cérvix humano HeLa;

(ii) fracaso en la replicación en un modelo de ratón que es incapaz de producir células B y T maduras y como tal está seriamente inmunocomprometido y es altamente susceptible a una replicación de virus e

(iii) inducción de al menos el mismo nivel de respuesta inmunitaria específica en regímenes de cebado de virus vaccinia/de refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con regímenes de cebado con ADN/de refuerzo de virus vaccinia.

Se ha depositado una de las cepas desarrolladas en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC, por sus siglas en inglés) con el número de depósito V00083008. Esta cepa se refiere como "MVA-BN" por toda la memoria descriptiva de la patente internacional WO 02/42480.

5 Los términos "no capaz de replicación reproductiva" o "incompetente para replicación" significa que el virus muestra una relación de multiplicación menor que 1 en estirpes celulares humanas, tales como las estirpes celulares 293 (ECACC N° 85120602), 143B (ECACC N° 91112502), HeLa (ATCC N° CCL-2) y HaCat (Boukamp et al., J. Cell Biol. 106 (3): 761-71 (1.988)), en las condiciones como se indica en líneas generales en el Ejemplo 1 de la patente internacional WO 02/42480 para algunas cepas específicas de MVA.

10 Según la patente internacional WO 02/42480, "fallo para replicarse *in vivo*" se refiere a virus que no se replican en seres humanos y en el modelo de ratones como se describe en la publicación de la patente internacional WO 02/42480.

15 Ha habido numerosos informes que sugieren que los regímenes de cebado/de refuerzo usando MVA como un vector de suministro inducen respuestas inmunitarias deficientes y son inferiores a los regímenes de cebado con ADN/de refuerzo de MVA (Schneider et al., Nat. Med. 4; 397-402 (1.998)). En todos estos estudios, se han usado cepas de MVA que son diferentes de los virus vaccinia cuando se desarrollan según la patente internacional WO 02/42480. Como una explicación para la respuesta inmunitaria deficiente obtenida cuando se usaba MVA para administración de cebado y de refuerzo, se ha realizado la hipótesis de que los anticuerpos generados para MVA durante la administración de cebado neutralizan el MVA proporcionado en la segunda inmunización, evitándose un refuerzo eficaz de la respuesta inmunitaria. Por el contrario, se indica que los regímenes de cebado con ADN/de refuerzo de MVA son superiores en la generación de altas respuestas de avidez, debido a que este régimen combina la capacidad de ADN para cebar de manera eficaz la respuesta inmunitaria con las propiedades de MVA para reforzar esta respuesta en ausencia de una inmunidad preexistente a MVA. Claramente, si una inmunidad preexistente a MVA y/o vaccinia evita el refuerzo de la respuesta inmunitaria, entonces el uso de MVA como una vacuna o terapia tendría eficacia limitada, en particular en los individuos que hayan sido vacunados contra la viruela. Sin embargo, las cepas de virus vaccinia según la patente internacional WO 02/42480, así como los correspondientes virus recombinantes que albergan secuencias heterólogas, se pueden usar para cebar primero de manera eficaz y reforzar después las respuestas inmunitarias en animales nativos así como en animales con una inmunidad preexistente a los poxvirus. Así, las cepas desarrolladas como se describe en la patente internacional WO 02/42480 inducen al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en regímenes de cebado de virus vaccinia/refuerzo de virus vaccinia comparado con los regímenes de cebado con ADN/refuerzo de virus vaccinia.

20 Se considera un virus vaccinia como inductor de al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en regímenes de cebado de virus vaccinia/refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con regímenes de cebado con ADN/refuerzo de virus vaccinia si la respuesta de CTL cuando se mide en uno de los dos o incluso en ambos ensayos, como se describe en la patente internacional WO 02/42480 es al menos sustancialmente la misma en los regímenes de cebado de virus vaccinia/refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con los regímenes de cebado con ADN/refuerzo de virus vaccinia.

25 El comportamiento del crecimiento de los virus vaccinia desarrollado según la patente internacional WO 02/42480, en particular el comportamiento del crecimiento de MVA-BN®, indica que las cepas son muy superiores a cualquier otra aislada de MVA caracterizada hasta ahora teniendo en cuenta la atenuación en estirpes celulares humanas y el fracaso en la replicación *in vivo*. Las cepas son, por lo tanto, candidatos ideales para el desarrollo de productos más seguros tales como vacunas o productos farmacéuticos.

30 Una respuesta inmunitaria es generada por el sistema inmunitario cuando una sustancia extraña o microorganismo entra en el organismo. Por definición, la respuesta inmunitaria se divide en una reacción específica y una no específica, aunque ambas están estrechamente entrecruzadas. La respuesta inmunitaria no específica es la defensa inmediata contra una amplia variedad de sustancias extrañas y agentes infecciosos. La respuesta inmunitaria específica es la defensa generada después de una fase de latencia, cuando el organismo se expone a una sustancia por primera vez. La respuesta inmunitaria específica es altamente eficaz y es responsable por el hecho de que un individuo que se recupera de una infección específica está protegido contra esta infección específica. Así, una segunda infección con el mismo agente infeccioso o uno muy similar produce síntomas mucho más leves o ningún síntoma en absoluto, puesto que ya hay una "inmunidad preexistente" a este agente. Dicha inmunidad y la memoria inmunológica persisten durante un largo tiempo, en algunos casos incluso toda la vida. De acuerdo con esto, la inducción de una memoria inmunológica puede resultar de la vacunación.

35 El "sistema inmunitario" significa un órgano complejo implicado en la defensa del organismo frente a sustancias extrañas y microorganismos. El sistema inmunitario comprende una parte celular que comprende diversos tipos de células, tales como, por ejemplo, linfocitos y otras células procedentes de glóbulos blancos y una parte humoral que comprende pequeños péptidos y factores de complemento.

Las estrategias de vacunación tradicionales pueden inducir protección eficaz y de larga duración por inducción de respuestas inmunitarias adaptativas (anticuerpos, CTL). Sin embargo, la protección sustancial sólo se puede conseguir después de varios días a meses, de manera óptima con un régimen de refuerzo, que deja al individuo

susceptible de infección durante ese tiempo.

El MVA es un virus de no replicación en seres humanos, que se puede administrar a las personas con diversos grados de desviación inmunitaria (VIH, alergias, dermatitis atópica, ciertos tratamientos con fármacos), incluso por rutas de aplicación sistémica. En estos casos de desviación inmunitaria, se reduce una población de células inmunitarias antivíricas especializadas (pDC) en número o se ve afectada en sus propiedades funcionales, que puede aumentar el riesgo de infección vírica.

La visión actual de la protección contra poxvirus mortales es por vacunaciones. Para estas propuestas, se exponen individuos a un poxvirus atenuado (menos patógeno) antes de la potencial exposición a un poxvirus patógeno. La vacunación induce respuestas inmunitarias adaptativas como las células T asesinas (CTL) y anticuerpos y una memoria contra el virus de la vacunación relacionado. Esto da como resultado algo de reactividad contra el virus patógeno que conduce a protección y rápida resurrección de las respuestas de la memoria con la exposición repetida. Sin embargo, las respuestas inmunitarias adaptativas requieren tiempo para desarrollarse y son óptimas después de reforzar la respuesta inmunitaria con la aplicación repetitiva del virus de la vacunación.

Recientemente, se ha indicado que, emplear MVA como virus de la vacunación varios días (como muy tarde 2 días) antes de la exposición con la cepa Western Reserve del virus Vaccinia (VV-WR), se puede conseguir algo de protección (patente internacional WO 2006/089690). Se han publicado resultados similares por otro grupo, que demostraron además tratamiento post-exposición fracasado para la protección de animales. (Staub, C. et al. J. Gen. Virol 87, 2.917-2.921 (2.006)). Los niveles de protección fueron 1 x LD50 si se vacunaban 2 días antes de exposición a VV-WR y 12,5x LD50 si se vacunaban 3 días después de exposición a VV-WR. (*Id.*)

Stittelaar et al., Nature 439: 745-748 (2.006) compararon los efectos del tratamiento antivírico y la vacunación de la viruela en la infección con virus de la viruela de los simios letal. Indicaron que cuando los simios eran vacunados 24 h después de la infección por el virus de la viruela de los simios, usando una dosis humana clásica de una vacuna de la viruela recomendada en la actualidad (Elstree-RIVM), no se observó una reducción significativa en la mortalidad.

La técnica anterior incluye <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5010a1.htm>. MMWR Recommendations and Reports, 22 de junio de 2.001 / 50(RR10); 1-25. La página 6 se refiere a la vacuna de la viruela de vaccinia Dryvax®. La página 15 de este documento se refiere a la eficacia de la post-exposición conocida de la vacuna contra la viruela.

Queda la necesidad en la técnica de reactivos y métodos para la protección inmediata contra la viruela.

Breve resumen de la invención

La invención es la siguiente:

1. Un poxvirus para uso para proteger a un ser humano contra la viruela después de exposición a él, en el que se tiene que administrar una composición inmunogénica que comprende dicho poxvirus al ser humano entre 0 y 72 horas después de exposición a viruela, en el que dicho poxvirus es un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).

2. Una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un poxvirus para uso para proteger a un ser humano contra la viruela después exposición a la misma, en la que dicha composición inmunogénica o vacuna se tiene que administrar al ser humano entre 0 y 72 horas después de exposición a viruela, en la que dicho poxvirus es un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).

3. El poxvirus, composición inmunogénica o vacuna para uso de acuerdo con el artículo 1 ó 2, en el que la composición inmunogénica, vacuna o poxvirus se administra a dicho ser humano entre 0 y 48 horas después de infección con el poxvirus.

4. Poxvirus, composición inmunogénica o vacuna según uno cualquiera de los artículos 1 a 3, en el que el MVA es una cepa caracterizada por al menos una de las siguientes propiedades:

(i) capacidad de replicación reproductiva *in vitro* en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero ninguna capacidad de replicación reproductora en una estirpe celular humana, como en la estirpe celular de queratinocitos humanos HaCaT, la estirpe celular 293 de riñón de embrión humano, la estirpe celular 143B de osteosarcoma óseo humano y la estirpe celular de adenocarcinoma de cérvix humano HeLa;

(ii) fracaso para replicarse en un modelo de ratón que es incapaz de producir células B y T maduras y como tal está inmunocomprometido en gran medida y es altamente susceptible a un virus de replicación e

(iii) inducción de al menos el mismo nivel de respuesta inmunitaria específica en regímenes de cebado de virus vaccinia/refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con regímenes de cebado de ADN/refuerzo de virus vaccinia.

5. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso de acuerdo con cualquiera de los artículos precedentes, en los que el MVA se tiene que administrar en una dosis de 10^5 a 5×10^8 TCID₅₀, preferiblemente en

una dosis de 10^7 a 5×10^8 TCID₅₀.

6. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según cualquiera de los artículos precedentes, en los que el MVA es la cepa como se deposita en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008.
- 5 7. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según cualquiera de los artículos precedentes, en los que el MVA es un MVA recombinante.
8. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según el artículo 7, en los que el MVA comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos que codifica al menos un epítipo antigénico.
- 10 9. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según el artículo 8, en los que el epítipo antigénico es un epítipo antigénico de un agente infeccioso.
10. Un poxvirus para uso en un método para la vacunación de un ser humano contra la viruela, en el que la vacunación es 0 a 72 horas post-exposición a la viruela, preferiblemente 0 a 48 horas post-exposición a la viruela y en el que dicho poxvirus es la cepa de MVA como se deposita en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008.
- 15 Se tiene que entender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada a continuación son ejemplares y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención, como se reivindica.

Breve descripción de los dibujos.

La descripción realizada y la invención se entienden más completamente con referencia a los dibujos, en los que:

20 La figura 1 a y b representan el análisis de la maduración de células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) en respuesta a poxvirus activos o inactivados. Histogramas de citometría de flujo que muestran la expresión de CD40 o CD69 en FL-DC después de incubación con poxvirus activos (panel izquierdo) o inactivos (panel derecho) (histogramas sombreados) como se indica. a) CVA, ECTV, CPXV. b) MVA, SFV, CNPV o sin estimulación (histogramas vacíos). Se muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos (CVA, ECTV, MVA) o dos (CPXV, SFV, CNPV).

25 La figura 2a-e representa la respuesta de DC deficiente en TLR9 o de cepa natural a infección con poxvirus *in vitro*, a) Histogramas de citometría de flujo que muestran la expresión de CD40 o CD69 en FL-DC de ratones sin manipular (panel izquierdo) o deficientes en TLR9 (panel derecho) después de incubación con CVA, ECTV o MVA como se indica (histogramas sombreados) o sin estimulación (histogramas vacíos). Los histogramas similares para la activación natural son parte de la figura 1. b) FL-DC o c) GM-DC de ratones deficientes en TLR9 (columna vacía) o sin manipular (columna rellena) se estimularon con MVA activo (panel izquierdo) o inactivado por UV (panel derecho) y se analizó en los sobrenadantes IFN- α e IL-6 por ELISA. d) Se estimularon FL-pDC y cDC clasificadas de ratones deficientes en TLR9 o sin manipular como se indica con MVA (columna rellena) o ECTV (columna vacía) y se analizó en los sobrenadantes IFN- α e IL-6 por ELISA. e) Se estimularon células de médula ósea totales con MVA activo (columna de rayas en diagonal) o inactivadas por UV (columna de rayas en horizontal) o CpG-2216 (columna en negro) y se analizó en los sobrenadantes IFN- α por ELISA. Se muestran experimentos representativos de al menos dos experimentos.

30

35

La figura 3 a y b representan la supervivencia de ratones sin manipular y deficientes en TLR9 a infección con ECTV. Se infectaron i. n. ratones sin manipular (a) y deficientes en TLR9 (b) con dosis variables de ECTV (TCID₅₀ por ratón) como se indica y se controló la supervivencia durante al menos 4 semanas. Los experimentos se realizaron con los números de ratones como se indica y los datos representan al menos 3 experimentos individuales para cada dosis vírica en ratones sin manipular (a) o 7 experimentos para la dosis de $1E+02$ para ratones de TLR9-KO (b) y un experimento para las otras dosis (b). Los datos para la dosis de $1E+04$ en ratones sin manipular (a) y $1E+02$ en ratones de TLR9-KO (b) incluyen ratones de control de la muerte de otros experimentos.

40

La figura 4 representa que MVA protege a ratones sin manipular si se proporcionan simultáneamente dosis letales de ECTV. Se infectaron i. n. ratones sin manipular con dosis letales de ECTV como se indica y se inocularon i. n. simultáneamente con (símbolos en negro) o sin (cuadrado gris) $1E+08$ TCID₅₀ de MVA y se controló la supervivencia durante 4 semanas. Se realizaron los experimentos con los números de ratones como se indica y los datos representan los resultados de dos experimentos individuales.

45

La figura 5 representa que MVA protege a ratones deficientes en TLR9 si se les administran simultáneamente dosis letales de ECTV. Se infectaron i. n. ratones deficientes en TLR9 con dosis letales de ECTV como se indica y se inocularon i. n. simultáneamente con (símbolos en negro) o sin (cuadrado gris) $1E+08$ TCID₅₀ de MVA y se controló la supervivencia durante 4 semanas. Se realizó el experimento con los números de ratones como se indica.

50

La figura 6 a y b representan que MVA protege a ratones deficientes en TLR9 y sin manipular contra exposición a ECTV letal si se aplica por vía subcutánea. a) Se infectaron i. n. ratones deficientes en TLR9 con $1E+02$ TCID₅₀ de

ECTV y se inocularon s. c. simultáneamente con $1E+08$ TCID₅₀ de MVA (cuadrados negros) o sin (cuadrado gris).
 b) Se infectaron i. n. ratones sin manipular con $1E+04$ TCID₅₀ de ECTV y se inocularon s. c. simultáneamente con $1E+08$ de TCID₅₀ de MVA (cuadrados negros) o con la correspondiente cantidad de $1E+08$ de TCID₅₀ de CVA inactivado por UV (triángulo negro). Se controló la supervivencia durante 4 semanas. Se realizaron los experimentos con los números de ratones como se indica y los datos representan los resultados de dos experimentos individuales para ratones sin manipular con MVA y un experimento para ratones sin manipular con CVA inactivado por UV o para ratones deficientes en TLR9 con MVA.

La figura 7 representa que MVA protege parcialmente a los ratones deficientes en IFN-I-R si se les administran simultáneamente dosis letales de ECTV. Se infectaron i. n. ratones deficientes en IFN-I-R con dosis letales de ECTV como se indica y se inocularon i. n. simultáneamente con $1E+08$ de TCID₅₀ de MVA (símbolos negros) o sin (símbolos grises) y se controló la supervivencia durante 4 semanas. Se realizaron los experimentos con los números de ratones como se indica y los datos representan los resultados de al menos dos experimentos individuales para la dosis de estimulación de ($1E+02$ y $1E+03$) o un experimento para la dosis de estimulación de $1E+04$ y $1E+05$.

La figura 8 representa la supervivencia a largo plazo a infección con ECTV incluso en presencia de MVA depende de respuestas inmunitarias adaptativas. Se infectaron i. n. ratones deficientes en RAG-1 con dosis de ECTV como se indica y se inocularon i. n. simultáneamente con $1E+08$ de TCID₅₀ de MVA (símbolos negros) o sin (símbolos grises) y se controló la supervivencia durante 4 semanas. Se realizó el experimento con los números de ratones como se indica.

La figura 9 a y b representan que MVA protege terapéuticamente a ratones deficientes en TLR9 si se aplica después de infección una dosis letal de ECTV. Se infectaron i. n. ratones deficientes en TLR9 con ECTV $1E+02$ de TCID₅₀. Después de los tiempos indicados de 24 h (a) o 48 h o 72 h (b) se inocularon i. n. los ratones infectados con ECTV con $1E+08$ de TCID₅₀ de MVA (símbolos negros) o sin (cuadrado gris) y se controló la supervivencia durante 4 semanas. Se realizaron los experimentos con los números de ratones como se indica y los datos muestran los resultados acumulados de 3 experimentos individuales (a) o un experimento (b). Obsérvese que el ratón de control 9 de a) incluye el ratón de control 3 de b).

Descripción detallada de la invención y descripción realizada.

Se usó un modelo animal aplicando por vía intranasal Ectromelia poxvirus de ratón específico de la especie y altamente patógeno. Como Variola, que es altamente específico para la especie humana, Ectromelia es altamente específico para los ratones. Tanto Ectromelia como Variola emplean un gran panel de estrategias inmunosupresoras y, cuando se compara con otros poxvirus patógenos por ejemplo, "Virus vaccinia Western Reserve", son evolutivamente más distantes a MVA. Además, ambos virus son altamente patógenos (números bajos de virus pueden establecer infección y causar la muerte que muchos de los individuos infectados) en sus huéspedes específicos. En gran medida, tanto Variola como Ectromelia, pueden infectar a sus huéspedes por la ruta respiratoria como una manera natural de infección. Por estas razones, la infección con Ectromelia en ratones es un buen sistema de modelo para infección de seres humanos por Variola.

Los experimentos en animales demuestran que la administración conjunta de MVA junto con una dosis altamente letal de poxvirus de ratón protege a los ratones inmediatamente contra la exposición mortal. Los ratones inmunocompetentes sobrevivieron a la infección en estas condiciones cuando se expusieron a al menos 47 veces la dosis letal de Ectromelia.

Además, se emplearon ratones inmunocomprometidos en el modelo de infección por Ectromelia. En un modelo, los ratones carecen del receptor antivírico TLR9 (TLR9-KO). Las pDC de los ratones TLR9-KO no pueden responder de la manera antivírica normal a ADN y virus ADN. Se encontró que estos ratones presentan un aumento drástico en la susceptibilidad a infección por Ectromelia (más de 100 veces más susceptible que los ratones inmunocompetentes).

Con investigación in vitro con células aisladas, se encontró que MVA no es tan dependiente de esta pDC antivírica especializada. Los datos descritos en la presente memoria mostraron que MVA puede emplear rutas inmunoestimuladoras adicionales que den como resultado la inducción de mecanismos antivíricos. Así, se analizó si ese MVA también podría proteger a los ratones TLR9-KO vía las rutas alternativas que se encontraron in vitro. Por supuesto, la aplicación de MVA al mismo tiempo que una dosis altamente mortal de Ectromelia protegió a los ratones TLR9-KO inmediatamente contra al menos 500 veces la dosis letal de Ectromelia.

Se ensayó otro modelo de ratón inmunocomprometido que carece de sensibilidad a interferones este tipo I (IFN-I). Se cree que estas citocinas son esenciales para la supervivencia de infección vírica en general. Inesperadamente, la aplicación de MVA en el momento de la infección con una dosis mortal de Ectromelia mostró alguna protección. Así, esta invención protege a individuos normales así como varios inmunocomprometidos contra patógenos mortales de otro modo.

A diferencia de los estudios previos, los datos descritos en la presente memoria con Ectromelia muestran que se puede conseguir protección inmediata (proporcionando proteger MVA al mismo tiempo que, o después de, el poxvirus patógeno). El nivel de protección no se consigue sólo mucho más temprano (al mismo tiempo/después

frente a como muy tarde 2 días antes), pero también es mucho más eficaz. En ratones inmunocompetentes, el factor de protección excede de 47 x LD50. Además, se demuestra que la protección en ratones inmunocomprometidos excede el factor de 500 x LD50. La infección por Ectromelia en ratones es el mejor modelo de infección disponible en la actualidad para correlaciones con infecciones por Variola en seres humanos.

- 5 Se muestra aquí que los poxvirus son reconocidos por rutas de reconocimiento dependientes e independientes de TLR9. En la presente memoria, se demuestra que los poxvirus patógenos como el virus Ectromelia suprime con eficacia el reconocimiento por la ruta independiente de TLR9 pero aún se reconocen en cierta extensión por TLR9.

10 Las DC plasmacitoides (pDC) son las únicas células que producen grandes cantidades de las citocinas antivíricas e inmunorreguladoras Interferones Tipo I (IFN-I) vía TLR9 (que reconoce ADN patógeno), mientras otras células pueden producir bajos niveles de IFN-I por diferentes rutas, independientes de TLR9.

15 En la presente memoria, se describe que algunos poxvirus patógenos como virus Ectromelia suprimen completamente la producción de IFN-I independiente de TLR9 de fibroblastos y cDC convencionales, mientras la producción de IFN-I conducida por TLR9 de pDC sólo es reducida pero no evitada. Los estudios de infección in vivo con el poxvirus específico de ratones Ectromelia reveló que los ratones que carecen de TLR9 presentan un aumento de más de 100 veces en susceptibilidad. No se encontró una susceptibilidad similar y cinética de muerte en ratones incapaces de responder a IFN-I, que se sabe que es esencial para luchar contra infección vírica. Se concluye que, en condiciones en que virus patógenos inhiben con eficacia el reconocimiento independiente de TLR9, la importancia del reconocimiento vírico dependiente de TLR9 y la producción de IFN-I llegan a ser esenciales. Así, se demuestra en la presente memoria que TLR9 es un PRR importante, y altamente relevante in vivo, para la defensa contra poxvirus.

20 MVA-BN®, un poxvirus altamente atenuado que ha perdido la capacidad para replicarse en mamíferos, es un potente inductor de respuestas inmunitarias adaptativas robustas y los individuos vacunados están protegidos contra poxvirus específicos de la especie (por ejemplo, poxvirus de ratón, poxvirus de los simios, Vaccinia). Sin embargo, la inducción eficaz de las respuestas inmunitarias adaptativas lleva varios días a semanas, que deja los individuos desprotegidos contra la exposición a estos patógenos durante ese tiempo. Se muestra en la presente memoria que MVA-BN® induce la producción de citocinas inmunoprotectoras innatas (por ejemplo, IFN-I), en gran medida vía rutas tanto dependientes como independientes de TLR9. Esta producción de citocinas inmunoprotectoras innatas por MVA es una respuesta inmunitaria no específica, que se puede emplear en estrategias para proteger contra una multitud de patógenos.

30 La administración conjunta de MVA-BN® junto con el poxvirus de ratón altamente patógeno Ectromelia protegió a ratones inmunocompetentes contra dosis de Ectromelia al menos 47 veces la dosis letal. En ausencia de TLR9, MVA indujo la protección inmediata para dosis de Ectromelia al menos 500 veces la dosis letal. Los experimentos demuestran además que incluso los ratones que carecen de sensibilidad a IFN-I se pueden proteger por administración de MVA. Puesto que MVA protege, si se aplica al mismo tiempo que, o después de, el poxvirus patógeno, los resultados descritos en la presente memoria muestran una protección inmediata, que es mucho más temprana pero además mucho más pronunciada (>500 x LD50) que los datos previos que muestran que MVA se tiene que aplicar lo más tarde 2 días antes de la exposición al virus patógeno para ganar algún beneficio de supervivencia (1 x LD50) (patente internacional WO 2006/089690 y Staib et al. 2.006, J. Gen. Virol. 87: 2.917-2.921 (2.006)).

35 La administración de MVA a lo largo del tiempo de infección por Ectromelia letal condujo a una protección inmediata sólida contra la muerte en ratones inmunocompetentes y deficientes en TLR9. Esta protección inmediata sólo fue parcialmente dependiente de una ruta de IFN-I funcional pero completamente dependiente de respuestas inmunitarias adaptativas, como se muestra con Receptor de IFN-I y ratones deficientes en Rag-1, respectivamente. En gran medida, MVA también salvó ratones deficientes de TLR9 si se administraba dos días completos después de una infección letal de otro modo con virus Ectromelia. Así, MVA indujo una protección inmediata sólida e incluso post-exposición contra infección por poxvirus letal en animales inmunocompetentes así como inmunocomprometidos.

40 MVA no solo protege inmediatamente, sino que la protección inducida es, además, de larga duración. Los ratones que carecen de TLR9 (LD50=19) tratados con sólo 1 aplicación de MVA se protegieron cuando se expusieron después de 9 semanas a dosis letales altas de Ectromelia (>500 x LD50).

45 MVA-BN® no sólo induce fuertes respuestas inmunitarias adaptativas (por ejemplo altos títulos de anticuerpos de neutralización), sino que además induce fuertes respuestas inmunitarias innatas vía células incluyendo células dendríticas, que producen IFN-I que conduce a una protección altamente eficaz y, en gran medida, inmediata contra la exposición a poxvirus letal. Así, MVA-BN® enlaza respuestas inmunitarias innatas y adaptativas que dan como resultado una protección inmediata y de larga duración para exposición a poxvirus letal. Esta protección se puede extender a otros patógenos usando un MVA recombinante que expresa epítopos antigénicos de los patógenos.

En estos estudios, MVA no solo protegía si se administraba alrededor del tiempo de infección, sino que la aplicación tan tardía como 2 días completamente y 3 días parcialmente protegía a los ratones de infección por ECTV letal. La

- evidencia científica previa para vacunación post-exposición en individuos sin tratamiento previo con orthopoxvirus no existe (Mortimer, P. P. 2.003. Can postexposure vaccination against smallpox succeed? Clin. Infect. Dis. 36: 622-629). Las afirmaciones de los sitios oficiales de Salud, por ejemplo WHO, del éxito potencial de las vacunaciones post-infección lo más probablemente eran con respecto a individuos que habían sido vacunados previamente contra la viruela, refiriéndose así a vacunación de refuerzo que lo más probablemente rápidamente, mejoraba las respuestas de la memoria adaptativa existentes. Sin embargo, después de la exitosa erradicación de la variola como un patógeno natural en los años 80, se puso fin a las vacunaciones extendidas y ahora la mayor parte de la población mundial no ha sido vacunada nunca antes. Por otra parte, los estudios previos se realizaron en pacientes que fueron vacunados con un poxvirus competente de replicación completamente, no MVA.
- 5 Los modelos animales que usan VACV-WR en ratones o MPXV en simios no han mostrado protección terapéutica (Stittelaar et al., J. Virol. 79: 7.845-7.851 (2.005); Staib et al., J. Gen. Virol. 87: 2.917-2.921 (2.006)).
- Diversas razones podían explicar las diferencias entre los modelos descritos y los hallazgos presentes. Tanto VACV-WR en ratones como MPXV en simios se consideran modelos que reflejan sólo una fase tardía de infección por viruela debido a las altas dosis no fisiológicas que se requiere que se apliquen para una infección letal de los respectivos animales de modelo. Sin embargo, las infecciones letales por ECTV en ratones pueden ser inducidas con bajas dosis de virus por la ruta respiratoria, pareciéndose más al comienzo de una infección por viruela natural. Además, VACV-WR induce patologías en ratones tales como alta neurovirulencia, bajada drástica de peso corporal y temperatura, características no típicas de ECTV en ratones o infecciones por VARV en seres humanos. Ésta y posiblemente otras razones conducen a una muerte muy rápida de los animales infectados, de nuevo no observada en el modelo de ECTV o durante infección por viruela natural.
- 15
- 20 En el caso de la exposición a MPXV en simios, se realizó vacunación terapéutica con VACV-Elstree. Se ensayó si sería inhibitorio VACV-Elstree y se encontró que la maduración de DC y la producción de citocinas in vitro se inhibía como se observa con otras cepas de VACV. Dado que la protección terapéutica requiere presumiblemente una inducción sólida de mecanismos inmunitarios innatos incluyendo citocinas antivíricas para enlazar el tiempo para las respuestas inmunitarias adaptativas con el desarrollo, la aplicación terapéutica de un orthopoxvirus no inhibitorio como MVA también podía ser beneficiosa en simios infectados con MPXV. Por supuesto, Staib y colaboradores (2.006) han mostrado que los ratones estaban mejor protegidos con MVA que con VACV-Elstree si se aplicaba lo más tarde 2 días antes de la exposición a VACV-WR (Staib et al., J. Gen. Virol. 87: 2.917-2.921 (2.006)). Así, MVA parece mostrar ventajas protectoras sobre VACV-Elstree en modelos de infección por orthopoxvirus patógenos donde la inducción de mecanismos inmunitarios innatos desempeña una función importante.
- 25
- 30 La descripción induce protección robusta y, en la mayor medida, inmediata a una dosis muy alta de exposición con un poxvirus específico de la especie en individuos normales así como inmunocomprometidos. Por otra parte, esta protección es de larga duración. La descripción proporciona un tratamiento ideal en condiciones en que se requiere rápida protección contra infecciones por poxvirus mortales (por ejemplo, terrorismo o exposición accidental a viruela u otros poxvirus patógenos).
- 35
- La descripción incluye el uso de MVA y MVA recombinante como herramientas de emergencia contra un gran panel de otros patógenos. La descripción incluye otros virus atenuados y bacterias como herramientas de emergencia contra un gran panel de patógenos. La descripción se podía emplear para intervención terapéutica, proporcionando las herramientas de emergencia, por ejemplo MVA, después de exposición al patógeno, por ejemplo, viruela.
- 40
- La descripción incluye el uso de un poxvirus para la preparación de una vacuna para la inducción rápida de una respuesta inmunitaria protectora en un animal, incluyendo un ser humano, en el que el poxvirus es incompetente para la replicación en el animal, incluyendo en el ser humano.
- 45
- La descripción también incluye una vacuna que comprende un poxvirus para la inducción rápida de una respuesta inmunitaria protectora en un animal, incluyendo un ser humano, en la que el poxvirus es incompetente para la replicación en el animal, incluyendo en el ser humano.
- 50
- La descripción incluye un método para la inducción rápida de una respuesta inmunitaria protectora en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende la etapa de administrar al animal, incluyendo el ser humano, un poxvirus que es incompetente para la replicación en el animal, incluyendo en el ser humano.
- 55
- El término "incompetente para la replicación" significa que el virus muestra una relación de multiplicación menor que 1 en estirpes celulares humanas, tales como las estirpes celulares 293 (ECACC N° 85120602), 143B (ECACC N° 91112502), HeLa (ATCC N° CCL-2) y HaCat (Boukamp et al., J. Cell Biol. 106 (3): 761-71 (1.988)), en las condiciones como se indica en líneas generales en el Ejemplo 1 de la patente internacional WO 02/42480 para algunas cepas de MVA específicas y que el virus no se replica en seres humanos y en el modelo de ratones como se describe en la publicación de patente internacional WO 02/42480.
- La descripción incluye un uso, vacuna o método como anteriormente, en que la respuesta inmunitaria protectora se genera en menos de 2 días.
- El poxvirus puede ser un virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), en particular MVA 575, MVA 572 y,

preferiblemente, MVA-BN®.

La descripción incluye usos, vacunas o métodos como anteriormente, en los que el virus es un virus purificado, clonado. En particular, la descripción incluye virus obtenidos en un procedimiento de cultivo sin suero.

5 El poxvirus se puede administrar en una dosis de 10^5 a 5×10^8 TCID₅₀. El poxvirus, en particular MVA se puede administrar, por ejemplo por aplicación oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intrauterina y/o subcutánea. En animales pequeños, la inoculación para inmunización se realiza preferiblemente por vía parenteral o por vía nasal, mientras en animales más grandes o seres humanos se prefiere una inoculación subcutánea, intramuscular u oral.

10 En el contexto de la presente descripción, el término “animal” cubre también seres humanos. Más en general, el animal es un animal vertebrado, preferiblemente un animal mamífero incluyendo un ser humano. Ejemplos específicos para animales son animales domésticos tales como perros, gatos, animales económicamente importantes tales como terneros, ganado, ovejas, cabras, caballos, cerdos y otros animales tales como ratones, ratas. La descripción también se puede usar para aves económicamente importantes tales como pavos, patos, gansos y gallinas si se usan virus que sean capaces de infectar a las células del ave pero no sean capaces de ser replicados a virus de progenie infecciosa en dichas células. El término “animales domésticos” como se usa en la presente descripción se refiere preferiblemente a animales domésticos mamíferos, más preferiblemente a perros, gatos, terneros, ganado, ovejas, cabra, cerdos, caballos, ciervos.

15 Preferiblemente, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora contra una infección por poxvirus, preferiblemente, una infección por viruela. La respuesta inmunitaria protectora puede proteger preferiblemente contra una dosis de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ó 500 LD 50 de viruela.

20 El poxvirus puede ser poxvirus recombinante, preferiblemente un MVA-BN® recombinante.

25 El poxvirus puede comprender al menos una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos. El término “heterólogo” como se usa en la presente solicitud se refiere a cualquier combinación de secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentre normalmente asociada íntimamente al virus por naturaleza. Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos heterólogos es una secuencia que codifica al menos un antígeno, epítipo antigénico y/o un compuesto terapéutico. Un “compuesto terapéutico” codificado por el ácido nucleico heterólogo en el virus recombinante puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico terapéutico tal como un ácido nucleico antisentido o un péptido o proteína con actividad biológica deseada. Los epítopos antigénicos y/o los antígenos pueden ser epítopos antigénicos y/o antígenos de un agente infeccioso. Los agentes infecciosos pueden ser virus, hongos, organismos eucariotas o procariontas unicelulares patógenos y organismos parásitos. Los virus se pueden seleccionar de la familia de: virus de la Influenza, Flavivirus, Paramixovirus, virus de la Hepatitis, virus de la inmunodeficiencia Humana o de virus que causan fiebre hemorrágica. El agente infeccioso puede ser *bacillus anthracis*.

30 La inserción de secuencias de ácidos nucleicos heterólogos es preferiblemente en una región no esencial del genoma del virus. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos heterólogos se inserta en un sitio de supresión de forma natural del genoma vírico (para MVA descrito en la patente europea PCT/EP96/02926). Los métodos de cómo insertar secuencias heterólogas en el genoma vírico tal como un genoma poxvírico son conocidos para un experto en la materia.

La descripción se refiere al poxvirus recombinante según la presente descripción para uso como vacuna o medicamento.

40 El virus MVA puede ser una cepa caracterizada por tener al menos uno, dos o preferiblemente tres de las siguientes propiedades ventajosas.

45 (i) capacidad de replicación reproductiva in vitro en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero no capacidad de replicación reproductiva en una estirpe celular humana, como en la estirpe celular de queratinocitos humanos HaCaT, la estirpe celular 293 de riñón de embrión humano, la estirpe celular 143B de osteosarcoma óseo humano y la estirpe celular de adenocarcinoma de cérvix humano HeLa;

(ii) fracaso para replicarse en un modelo de ratón que es incapaz de producir células B y T maduras y como tal está seriamente inmunocomprometido y es altamente susceptible a un virus de replicación e

(iii) inducción de al menos el mismo nivel de respuesta inmunitaria específica en regímenes de cebado de virus vaccinia/refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con regímenes de cebado de ADN/refuerzo de virus vaccinia.

50 Para la preparación de composiciones inmunogénicas, los virus vaccinia MVA se convierten en una forma fisiológicamente aceptable. Esto se puede hacer basándose en la experiencia en la preparación de vacunas de MVA usadas para vacunación contra la viruela (como se describe por Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99: 2.386-2.392 (1.974)). Típicamente, aproximadamente 10^6 - 10^8 partículas del MVA recombinante se liofilizan en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia de 2% de peptona y 1% de albúmina humana en una ampolla, preferiblemente una ampolla de vidrio. El liofilizado puede contener extendedores (tales como manitol, dextrano,

55

azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona) u otros agentes auxiliares (tales como antioxidantes, estabilizantes, etc.) adecuados para administración parenteral. La ampolla de vidrio se sella después y se puede almacenar, preferiblemente a temperaturas por debajo de -20°C, durante varios meses.

5 Para administración o terapia se puede disolver el liofilizado en 0,1 a 0,5 ml de una disolución acuosa, preferiblemente disolución salina fisiológica y se administra por vía parenteral, por ejemplo por inoculación intramuscular. Las composiciones inmunógenas, vacunas o terapéuticos se inyectan preferiblemente por vía intramuscular (Mayr, A. et al., Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167: 375-390 (1.978)). El modo de administración, la dosis y el número de las administraciones pueden ser optimizados por los expertos en la materia de una manera conocida. Es beneficioso, en el caso de que sea apropiado, administrar las composiciones inmunógenas, vacunas o compuestos terapéuticos una vez o varias veces durante un periodo variable para obtener respuestas inmunitarias apropiadas contra el antígeno extraño.

El poxvirus puede ser un orthopoxvirus inactivado. Preferiblemente, el orthopoxvirus es inactivado con radiación UV. El orthopoxvirus puede ser CVA, ECTV o CPXV.

15 Es un objeto de la descripción proporcionar un método para vacunar a un individuo contra un patógeno de manera que se proporcione protección inmediata. El individuo puede ser vacunado con MVA, preferiblemente MVA-BN®, próximo al tiempo de exposición patogénica. Preferiblemente, la vacunación es entre 2 días previos a la exposición y 3 días post-exposición. Más preferiblemente, la vacunación es entre 2 días previos a la exposición y 1 día post-exposición. Incluso más preferiblemente, la vacunación es entre 1 día previo a la exposición y 1 día post-exposición. La vacunación puede ser a los 2 días previos, 36 horas previas, 1 día previo, 12-24 horas previas o 0-12 horas previas a la exposición. La vacunación también puede ser al tiempo de la exposición o 0-12 horas post-exposición, 12-24 horas post-exposición, 1 día post-exposición, 2 días post-exposición, 0-36 horas post-exposición, 0-48 horas post-exposición, 0-60 horas post-exposición, 0-72 horas post-exposición, 3 días post-exposición, 4 días post-exposición o incluso 10 días post-exposición.

25 La descripción incluye un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso en un animal que comprende administrar al animal una composición inmunogénica que comprende un MVA, preferiblemente MVA-BN®, a los 2 a 0 días o 1 a 0 días, o cualquier otra combinación de las horas comprendidas por estos días (por ejemplo, 48-36, 48-24, 36-24, 24-12, 12-0, etc.) previos a infección con un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser un poxvirus competente para replicación. El animal puede ser un ser humano.

30 La descripción incluye un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso en un animal que comprende administrar al animal una composición inmunogénica que comprende un MVA, preferiblemente MVA-BN®, a los 0 a 3 días, 0 a 2 días, 0 a 1 día o 1 a 2 días, o cualquier otra combinación de las horas comprendidas por estos días (por ejemplo, 0-12, 12-24, 24-36, 24-48, 24-72, 36-48, 48-60, 48-72, etc.) después de infección con un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser un poxvirus competente para replicación. El animal puede ser un ser humano.

35 La descripción incluye además usos de los métodos anteriores y estuches que comprenden una composición inmunogénica que comprende un MVA, preferiblemente MVA-BN® e instrucciones para suministrar la composición inmunogénica en un instante del tiempo entre 2 y 0 días previos a exposición a un agente infeccioso, incluyendo 2, 1 ó 0 días previos a la exposición, así como 36, 12, 6, 3 ó 1 hora previa a exposición. El instante de tiempo puede estar dentro de cualquier combinación de las horas comprendidas por estos días (por ejemplo, 48-36, 48-24, 36-24, 24-12, 12-0, etc.) previos a infección con un agente infeccioso.

45 La descripción también incluye usos de los métodos anteriores y estuches que comprenden una composición inmunogénica que comprende un MVA, preferiblemente MVA-BN® e instrucciones para suministrar la composición inmunogénica en un instante de tiempo entre 0 y 3 días después de exposición a un agente infeccioso, incluyendo 0, 1, 2 ó 3 días después de exposición, así como 1, 3, 6, 12, 36 ó 60 horas después de exposición. El instante de tiempo puede estar dentro de cualquier combinación de las horas comprendidas por estos días (por ejemplo, 0-12, 12-24, 24-36, 24-48, 24-72, 36-48, 48-60, 48-72, etc.) después de infección con un agente infeccioso.

50 La descripción también incluye estuches para la inducción de una respuesta inmunitaria protectora en un animal. Preferiblemente, dicha respuesta inmunitaria se dirige contra un agente infeccioso como se define en la presente memoria. El estuche puede comprender una composición inmunogénica que comprende un poxvirus, en el que dicho poxvirus es incompetente para la replicación en dicho animal. Dicho poxvirus puede ser un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA). El estuche también puede comprender instrucciones para el suministro de la composición inmunogénica. El MVA es preferiblemente MVA-BN. Preferiblemente, la composición inmunogénica contiene 10^5 a 5×10^8 TCID₅₀/ml de MVA. El animal puede ser un ser humano. Las instrucciones para suministro de la composición inmunogénica pueden dirigirse al suministro en diversos instantes de tiempo previos a exposición después de exposición a un agente infeccioso. Estos instantes de tiempo pueden incluir instantes de tiempo entre 2 días previos a exposición a un agente infeccioso y 3 días después de exposición al agente infeccioso. Las instrucciones se pueden dirigir a que el MVA se suministra después de exposición al agente infeccioso, preferiblemente tan pronto como sea posible después de la exposición al agente infeccioso, que es preferiblemente viruela. El estuche puede comprender además un agente infeccioso como se define en la presente memoria en un vial separado e

instrucciones para el suministro del agente infeccioso a un animal, incluyendo un ser humano. El agente infeccioso se puede seleccionar de bacillus anthracis o viruela.

En este contexto, una "exposición" significa contacto con el propio agente infeccioso o con un animal (ser humano) que hospeda al agente infeccioso. Por ejemplo, las instrucciones se pueden dirigir a que la composición inmunogénica puede ser suministrada a las 36, 24, 12, 6, 3 ó 1 a 0 horas previas a la exposición a un agente infeccioso o a las 0 a 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 ó 72 horas después de exposición a un agente infeccioso. Por ejemplo, las instrucciones pueden dirigirse al suministro a las 48-36, 48-24, 36-24, 24-12, 12-0, etc., previas a infección con un agente infeccioso o 0-12, 12-24, 24-36, 24-48, 24-72, 36-48, 48-60, 48-72, etc. después de infección con un agente infeccioso. Preferiblemente, el agente infeccioso es viruela o *bacillus anthracis*. Las instrucciones se pueden dirigir a que el MVA se puede administrar por vía intravenosa, por vía intramuscular y/o por vía subcutánea. Las instrucciones se pueden dirigir a que el MVA es administrado por vía intranasal.

El patógeno es preferiblemente un virus o una bacteria. El patógeno puede ser un poxvirus, preferiblemente un virus Variola.

El individuo puede ser un ser humano sano o puede ser un ser humano inmunocomprometido, por ejemplo, un individuo infectado con VIH-1, un individuo con dermatitis atópica, un paciente que toma fármacos inmunosupresores o un individuo con alergias.

El virus vaccinia Ankara modificado (MVA), una cepa de virus vaccinia restringida al intervalo de huéspedes y altamente atenuada, es incapaz de multiplicarse en el ser humano y otros mamíferos ensayados. Pero, puesto que la expresión génica vírica no está debilitada en células no permisivas, los virus de MVA recombinante de acuerdo con la descripción se pueden usar como vectores de expresión excepcionalmente seguros y eficaces.

Los poxvirus incluyendo el agente causativo de viruela, virus variola, han desarrollado múltiples estrategias para suprimir las respuestas inmunitarias. Se proporciona evidencia de que se reconocen poxvirus vía rutas dependientes de receptor de tipo toll (TLR)9 así como independientes de TLR9. Los poxvirus patógenos suprimieron con eficacia su reconocimiento vía la ruta independiente de TLR9 empleada por células dendríticas convencionales (DC), pero fueron detectadas por DC plasmacitoides (pDC) vía TLR9. La ausencia de TLR9 anuló la respuesta de DC *in vitro* y aumentó drásticamente la susceptibilidad de los ratones a la infección con el virus Ectromelia de poxvirus murinos (ECTV). La administración simultánea de virus vaccinia Ankara modificado (MVA)-BN® en el momento de la infección condujo a una protección inmediata sólida contra ECTV, incluso en ausencia de TLR9 o receptor de interferón tipo I (IFN-I-R). MVA-BN® también salvó ratones si se suministraba después de infección con ECTV. Así, MVA-BN® indujo una protección inmediata sólida e incluso post-exposición contra infección con ECTV letal en ratones inmunocompetentes así como inmunocomprometidos.

Los datos presentados a continuación en los Ejemplos 1 a 11 demuestran que los poxvirus, como se mostró previamente para otras familias de virus ADNds, son detectados vía rutas de reconocimiento dependientes de TLR9 así como independientes de TLR9. Se encontró que MVA, un VACV altamente atenuado que ha perdido su capacidad para replicarse en células humanas, era reconocido por pDC por rutas tanto dependientes de TLR9 como independientes de TLR9, mientras en cDC sólo se reconoció por la ruta independiente de TLR9. Este hallazgo es consistente con hallazgos previos con HSV-1 (Hochrein, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101, 11.416-11.421 (2.004)). Sin embargo, en marcado contraste, el reconocimiento de los poxvirus patógenos, incluyendo varias cepas de VACV, ECTV o CPXV se basó de manera crítica en TLR9 y pDC, probablemente debido a la potente capacidad de estos virus para inhibir su reconocimiento por rutas independientes de TLR9. En ausencia de pDC o TLR9, este potencial inhibitorio anuló casi completamente el reconocimiento inmunitario y así la respuesta por DC *in vitro*. Esto trasladado al modelo de infección *in vivo* con ECTV, donde los ratones deficientes en TLR9 fueron más de 100 veces más susceptibles que los ratones sin manipular.

Puesto que la respuesta a los virus VACV, CPXV y ECTV inactivados dependía de la presencia de TLR9, estos virus inhiben lo más probablemente las rutas de activación tanto dependientes de TLR9 como las independientes de TLR9. Sorprendentemente, en ausencia de TLR9, esta inhibición fue virtualmente absoluta ya que incluso la lectura más sensible de maduración de DC (expresión de CD69) fue suprimida. Se han implicado diversos genes inhibidores codificados por poxvirus incluyendo el producto VACV de A46R y A52R (Bowie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 10.162-10.167 (2.000); Harte et al., J. Exp. Med. 197: 343-351 (2.003); Stack et al., J. Exp. Med. 201: 1.007-1.018 (2.005)) en la inhibición de moléculas de señalización de TLR. Las comparaciones genéticas de ECTV, CVA, CPXV y MVA muestran que los 4 virus tienen homólogos de A46R (Meisinger-Henschel et al., J. Gen. Virol. 88: 3.249-3.259 (2.007)). CVA y CPXV también expresan homólogos de A52R mientras MVA carece de este componente. La cepa de ECTV Moscow que se ha usado para este estudio presentaba un gen A52R fragmentado que lo más probablemente no es funcional (Chen et al., Virology 317: 165-186 (2.003)). Para aclarar la función potencial de A46R y A52R en la inhibición de activación de DC por las rutas de reconocimiento dependientes e independientes de TLR9, se han construido VACV recombinantes que carecen o que expresan A46R y A52R. Un MVA recombinante que expresa A52R así como A46R endógeno, pareciéndose así al CVA inhibidor (que expresa de manera endógena A46R y A52R), no demostró ninguna inhibición aumentada significativa comparado con MVA de cepa natural como se juzga por los análisis de maduración de DC e inducción de citocinas. Por el contrario, un mutante de supresión de CVA que ni expresa A46R ni A52R no perdió su potencial inhibitorio. Esto está de acuerdo

con datos publicados previamente que muestran que VACV deficiente en A52R aún retenía la actividad inhibitoria contra la maduración de DC (Drillien et al., *J. Gen. Virol.* 85: 2.167-2.175 (2.004)). Tomados juntos, estos datos sugieren que ni A46R (expresado de manera endógena por el MVA no inhibitorio) ni A52R son el componente inhibitorio principal del reconocimiento dependiente de TLR9 o independiente de TLR9 definido en este estudio.

5 La naturaleza del reconocimiento independiente de TLR9 en respuesta a MVA es aún elusivo como son las rutas de reconocimiento en respuesta a otros virus ADN (Ishii et al., *Trends Immunol* 27: 525-532 (2.006)). Sin embargo, informes recientes excluyen la dependencia absoluta de la presencia de las moléculas adaptadoras asociadas a TLR MyD88 y TRIF así como PKR (Zhu et al., *Blood* 109: 619-625 (2.007); Waible et al., *J. Virol.* 81: 12.102-12.110 (2.007)). Recientemente se identificó un nuevo sensor intracelular para ADN (DAI) (Takaoka et al., *Nature* 448: 501-505 (2.007)). La infección de células en la presencia o ausencia de un ARNsi que silencia DAI indicó que la respuesta a ADN transinfectado o HSV-1 pero no a ARN fue hasta cierto punto dependiente de DAI. Sin embargo, la respuesta a HSV-1 se redujo pero no se suprimió (no se ensayaron las respuestas a poxvirus) que sugiere la existencia de rutas de reconocimiento de virus ADN adicionales; Otros han mostrado que los fibroblastos de embrión de ratón respondían a MVA (ausencia del gen E3L) independientemente de la presencia de los miembros de la familia de las cinasas I κ B no canónicas, TBK1 e IKKi (Ishii et al., *Nat. Immunol.* 7: 40-48 (2.006)) y que la inducción de IFN- α en respuesta a MVA fue independiente de la propagación del virus y la replicación de ADN (Waible et al., *J. Virol.* 81: 12.102-12.110 (2.007)).

En el caso de reconocimiento independiente de TLR9 de HSV, publicaciones recientes sugieren que diferentes tipos de células pueden tener diferente requerimiento. En cDC, la respuesta de IFN fue independiente de la replicación vírica pero dependiente de la entrada vírica. Por el contrario, que macrófagos y fibroblastos, la producción de IFN-I fue dependiente de tanto entrada vírica como replicación y además una ruta de proteínas de señalización mitocondrial funcional, que sugiere una posible implicación de componentes de ARN (Rasmussen et al., *J. Virol.* 81: 13.315-13.324 (2.007); Weber et al., *J. Virol.* 80: 5.059-5.064 (2.006)). Así, el reconocimiento inmunológico de virus ADN parece al menos tan redundante como el reconocimiento de virus ARN. Los mecanismos supresores desarrollados por diferentes virus, algunos de los empleados por poxvirus, lo más probablemente ponen una enorme presión evolutiva sobre el desarrollo de rutas de reconocimiento de virus ADN redundantes.

Los poxvirus se dividen en dos subfamilias, los poxvirus que infectan invertebrados por ejemplo, insectos (entomopoxvirinae) y poxvirus que infectan vertebrados (chordopoxvirinae). Muchos, si no todas las especies de vertebrados, han batallado durante la evolución para su supervivencia contra poxvirus altamente patógenos. Hoy, se conocen poxvirus que infectan reptiles, aves y muchas especies diferentes de mamíferos. Se sabe que los vertebrados tan tempranos como los peces responden a estimulación de CpG-ADN que sugiere la expresión de TLR9. Se podía especular que el sistema de TLR9, así como el subgrupo de DC especializadas que emplea TLR9 para producción de IFN-I, pDC, se optimizaron bajo fuerte presión evolutiva para la detección de, y la defensa contra, infecciones por poxvirus.

35 La expresión de TLR9 en células de murina y humanas difiere enormemente. Mientras en las células pDC y B de ambas especies son positivas para TLR9 y responden a estimulación de TLR9, los subgrupos de cDC murinas y macrófagos también expresan TLR9. Por otra parte, diferentes tipos de células incluso dentro de una especie responden de manera diferencial y de manera selectiva a ligandos TLR9. Esto incluye no sólo la única capacidad de producción de IFN- α de pDC sino que también se demuestran respuestas selectivas de células B a diferentes agonistas de TLR9. Previamente, se describió que las células B de murina se activan y proliferan a un CpG-ODN tipo B pero no a un CpG-ODN Tipo A o a ADN plásmido purificado (Spies et al., *J. Immunol.* 171: 5.908-5.912 (2.003)). Una posible explicación podía ser la absorción específica del tipo de célula y el tratamiento endosómico de diferentes ligandos de TLR9. Esto también podía explicar posiblemente por qué las cDC empleadas en este estudio sólo mostraban la estimulación independiente de TLR9, pero no ninguna dependiente de TLR9 en respuesta a MVA, a pesar de que expresan TLR9 y responden al CpG-ODN agonista de TLR9 artificial.

La inmunoprotección inducida por MVA fue claramente relevante en un entorno carente de respuestas de TLR9 y así inmunoadactivación en respuesta a MVA fue no solamente dependiente de TLR9 o pDC. Esta característica de MVA para inducir inmunoadactivación independiente de pDC e IFN-I podía ser importante en las condiciones descritas en seres humanos donde se disminuyen los números o la función de pDC y así la producción de IFN-I dependiente de TLR9. Entre estos están pacientes de cáncer y de trasplantes, personas que toman fármacos inmunosupresores y personas con VIH, incluso bajo tratamiento antivírico ((Hashizume et al., *J. Immunol.* 174, 2.396-2.403 (2.005); Donaghy, HV et al., *Blood* 98, 2.574-2.576 (2.001); Chehimi, J. et al., *J. Immunol.* 168, 4.796-4.801 (2.002); Boor, P. P. et al., *Am. J. Transplant.* 6, 2.332-2.341 (2.006); Siegal, F. P. et al., *J. Clin. Invest* 78, 115-123 (1.986)). Además, algunas condiciones inmunitarias como las alergias están asociadas a la producción reducida de IFN-I inducida por virus (Bufe et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 127: 82-88 (2.002)). Hay que señalar que, la mayoría de estas condiciones ha sido definida como contraindicadas para la aplicación de vacunas de viruela competentes para replicación.

Aunque se encuentra que MVA puede proteger en cierta extensión a los ratones deficientes en IFN-I-R contra infección por ECTV (Fig. 7), la aplicación del virus vaccine de la viruela tradicional, Dryvax, mató a estos ratones incluso sin exposición a ECTV. Este hallazgo fue consistente con informes previos sobre letalidad para VACV Wyeth en otros ratones inmunocomprometidos (Wyatt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 4.590-4.595 (2.004); Perera

et al., *J. Virol.* 81: 8.774- 8.783 (2.007)).

Este estudio demuestra que MVA proporcionado al mismo tiempo que dosis letales de ECTV protegía ratones sin manipular y deficientes en TLR9 contra la muerte (Fig. 4, Fig. 5) sin tener en cuenta el sitio de aplicación, (Fig. 6), el protocolo denominado "protección inmediata". Estos hallazgos indican que MVA induce respuestas inmunitarias innatas sólidas y así se abarca el tiempo necesario para desarrollar respuestas inmunitarias adaptativas.

Para definir los mecanismos de la fase de protección innata, se aplicó el protocolo de protección inmediato a ratones que carecían de capacidad de respuesta a IFN-I. En la exposición a dosis altas, estos ratones no estaban protegidos en la misma extensión que los ratones sin manipular, que sugiere que IFN-I es parte de la protección. Sin embargo, los ratones de IFN-I-R estaban protegidos para dosis menores, pero sin embargo letales, de ECTV, que demuestra claramente que otros mecanismos pueden sustituir IFN-I durante la fase innata del protocolo de protección inmediata.

Una función para TNF- α en la protección contra ECTV se mostró previamente por la susceptibilidad aumentada de ratones deficientes en Receptor-TNF a infección por ECTV así como por la atenuación de VACV que codifica TNF- α (Ruby et al., *J. Exp. Med.* 186: 1.591-1.596 (1.997)). Usando métodos similares, se indicaron actividades antivíricas para IL-2, IL-6, IL-12, IFN-gamma, IFN-lambda, CD40L, Mig, IP-10, NO y complemento (Esteban et al., *J. Gen. Virol.* 86: 2.645-2.659 (2.005); Ramshaw et al., *Immunol. Rev.* 159: 119-135 (1.997); Bartlett et al., *J. Gen. Virol.* 86: 1.589-1.596 (2.005); Niemialowski et al., *Acta Virol.* 38: 299-307 (1.994)). Aparte de componentes solubles, mecanismos innatos celulares como la inducción de células NK parecen desempeñar una función importante durante las infecciones con poxvirus incluyendo infección por ECTV (Parker et al., *J. Virol.* 81: 4.070-4.079 (2.007)). Éstos y otros mecanismos pueden estar implicados en la protección inmediata mediada por MVA.

El fracaso en el protocolo de protección inmediata para inducir protección sostenida en ausencia de respuestas inmunitarias adaptativas (Fig. 8) indicó claramente que la supervivencia dependía por último de respuestas inmunitarias adaptativas. La prolongación de la supervivencia en los ratones deficientes en RAG-1 también proporcionó alguna indicación de la duración de los mecanismos innatos de protección sólida pero como se describió previamente para estrategias de vacunación tradicionales, la supervivencia a infección por poxvirus patógena requiere por último mecanismos adaptativos para eliminar el virus. Este requisito previo hace improbable que la sola inducción de mecanismos innatos como la aplicación de IFN-I, ligandos TLR u otros estímulos innatos no específicos serían suficientes en la protección para infección por poxvirus letales si las respuestas inmunitarias adaptativas no fueran provocadas con eficacia al mismo tiempo. El experimento con CVA inactivado por UV (Fig. 6b) que soporta antígenos de orthopoxvirus y presumiblemente activa vía TLR9 sugirió que se podía conseguir alguna protección limitada en ratones inmunocompetentes. Sin embargo, el hecho de que todos los ratones al menos llegarán a enfermar, en marcado contraste con los ratones tratados con MVA activo que permanecieron sin síntomas, indicó que la protección vía el MVA activo es mucho más sólida.

Se identificó TLR9 como una molécula de reconocimiento esencial y altamente relevante in vivo para poxvirus. En gran medida, proporciona evidencia para el uso de MVA-BN® como una manera para intervención inmediata y terapéutica contra potencial infección por poxvirus fatal en individuos sanos así como inmunocomprometidos.

Aquí, se confirman los datos previos de que los miembros de la familia de poxvirus son reconocidos vía rutas de reconocimiento independientes de TLR (Zhu, J. et al. *Blood* 109, 619-625 (2.007)). Sin embargo, se sabe que los poxvirus se observan también vía la ruta dependiente de TLR9. Se muestra que algunos poxvirus, como ECTV, suprimen con eficacia el reconocimiento por las rutas independientes de TLR9 pero aún se reconocen vía TLR9.

Las DC plasmacitoides (pDC) son las únicas células en seres humanos y ratones que producen grandes cantidades de interferón de tipo I (IFN-I) por la ruta de TLR9, mientras que otras células incluyendo DC convencionales (cDC) son capaces de producir IFN-I por diferentes rutas, independientes de TLR9. Se muestra en la presente memoria que algunos poxvirus suprimen completamente la producción de IFN-I independiente de TLR9 y afectan a la maduración de DC, mientras que la producción de IFN-I conducida por TLR9 de pDC no se evita completamente.

Estudios in vivo con ECTV, un patógeno de ratón natural, revelaron que la ausencia de TLR9 hace a los ratones más de 100 veces más susceptibles a infección. Se pudo encontrar una cinética de susceptibilidad y muerte similar en ratones incapaces de responder a IFN-I, que se piensa que es esencial para controlar la infección vírica (Muller, U. et al. *Science* 264, 1.918-1.921 (1.994)). Así, en condiciones en que los virus ADN patógenos inhiben con eficacia su reconocimiento independiente de TLR9, las funciones de reconocimiento vírico dependiente de TLR9, la producción de IFN-I y así pDC llegan a ser críticas al menos para mecanismos de defensa primarios durante la infección.

MVA, un ortovirus altamente atenuado que ha perdido la capacidad para replicarse en mamíferos, es un potente inductor de respuestas inmunitarias adaptativas robustas y los individuos vacunados son protegidos contra otras especies de poxvirus dentro del género Orthopoxvirus (por ejemplo, virus de la viruela de los simios (MPXV)) (Earl, P. L. et al. *Nature* 428, 182-185 (2.004); Stittelaar, K. J. et al. *J. Vir.* 79, 7.845-7.851 (2.005)). Debido a una incapacidad para replicarse en mamíferos, se ensaya MVA como un candidato vacuna incluso en individuos altamente inmunocomprometidos (Gherardi et al., *J. Gen. Virol.* 86: 2.925-2.936; Staib et al., *J. Gen. Virol.* 87: 2.917-2.921 (2.006)). Sin embargo, la inducción eficaz de respuestas inmunitarias adaptativas lleva varios días a semanas

y los informes previos han mostrado que los beneficios de supervivencia limitados contra poxvirus patógenos sólo se pueden conseguir con la aplicación del virus de vacunación los últimos dos días antes de exposición al virus de exposición (Staib, C. et al. J. Gen. Virol. 87, 2.917-2.921 z

5 Se muestra en la presente memoria que MVA-BN induce la producción de citosinas inmunoprotectoras innatas (por ejemplo, IFN-I) *in vitro* vía rutas tanto dependientes como independientes de TLR9. A diferencia de los poxvirus tales como ECTV, MVA no inhibió la capacidad de DC para reconocerlo por rutas independientes de TLR9. Esta propiedad puede ser útil en la protección contra poxvirus que muestran un fenotipo más inhibitorio.

10 La administración de MVA-BN al mismo tiempo que altas dosis del virus de la viruela de los ratones altamente patógeno y específico de la especie, ECTV, protegió no sólo a los ratones inmunocompetentes contra la muerte, sino también a los ratones que carecían de TLR9 o capacidad de respuesta a interferón de tipo I. Los ratones sin una respuesta de IFN-I funcional se protegieron para exposiciones a ECTV bajas e intermedias sin embargo sucumbieron a infección si se usaron mayores dosis indicando que un mecanismo de protección implica IFN-I que puede ser sustituido en cierta extensión por otros medios. Sin embargo, los ratones que carecen de respuestas inmunitarias adaptativas (ratones deficientes en Rag-1) sólo presentaron alguna ventaja temporal con administración de MVA, pero todos los ratones murieron finalmente indicando que la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas es esencial para la protección total para infección por poxvirus letal. Así, MVA fue capaz de activar una respuesta inmunitaria *in vivo* por rutas independientes de TLR9, incluso en presencia de un poxvirus que inhibía potencialmente este reconocimiento. En gran medida, incluso la aplicación post-exposición de MVA-BN protegió a ratones deficientes en TLR9 de la muerte contra infección letal por ECTV.

20 Este estudio demuestra que TLR9 es un PRR importante y altamente relevante *in vivo*, para el reconocimiento de, y la defensa contra, poxvirus. Por otra parte, incluso en condiciones de sistemas inmunitarios comprometidos, MVA-BN activa y conecta las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, dando como resultado protección de larga duración pero también en gran medida inmediata y terapéutica contra exposición a poxvirus letal.

25 Los datos presentados demuestran claramente que los poxvirus, como se mostró previamente para otras familias de virus ADNds, son detectadas por rutas de reconocimiento dependientes de TLR9 así como independientes de TLR9. Se encontró que el MVA, un VACV altamente atenuado que ha perdido su capacidad para replicarse en células humanas, era reconocido por pDC por las rutas tanto dependientes de TLR9 como independientes de TLR9, mientras que en cDC sólo fue reconocido por la ruta independiente de TLR9. Después de inactivación por UV de MVA una población mixta que consistía en pDC y cDC produjo citocinas sólo en presencia de TLR9 (Fig. 2b). Este hallazgo se parecía estrechamente a nuestros hallazgos previos con HSV-1 donde el virus activo inducía IFN- α *in vitro* en varios subgrupos de DC y macrófagos independientes de TLR9 mientras que pDC empleaban además una ruta dependiente de TLR9, que también reconocía HSV inactivado (Hochrein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 11.416-11.421 (2.004)). Los métodos de inactivación empleados (inactivación por calor en el caso de HSV-1 e irradiación UV fuerte en el caso de MVA) dio como resultado potencialmente la absorción selectiva de los virus en diferentes compartimentos celulares (virus activos en el citosol y el endosoma mientras la absorción de virus inactivados podía estar restringida a la ruta endosómica). Esto podía ser una explicación para la dependencia completa de TLR9 después de inactivación.

35 Sin embargo, en marcado contraste con MVA, se muestra en la presente memoria que el reconocimiento de los poxvirus patógenos, incluyendo varias cepas de VACV, ECTV o CPXV se basaba de manera crítica en TLR9 y pDC debido a la potente capacidad de estos virus para inhibir su reconocimiento por rutas independientes de TLR9. En ausencia de pDC o TLR9, este potencial inhibitorio anuló casi completamente el reconocimiento inmunitario y así la respuesta por DC *in vitro*. Los hallazgos *in vitro* traducidos al modelo de infección *in vivo* con ECTV, donde los ratones deficientes en TLR9 fueron más de 100 veces más susceptibles que los ratones sin manipular (Fig. 3). Otros modelos de infección por virus ADNds en ratones deficientes en TLR9 no han mostrado aumento de susceptibilidad como en el caso de infecciones con HSV- 1 o sólo aumentos moderados dentro de un estrecho intervalo en el caso de infecciones con MCMV (Krug et al., Blood 103: 1.433-1.437 (2.004); Tabeta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 3.516-3.521, (2.004); Delale et al., J. Immunol. 175: 6.723-6.732 (2.005)).

40 Este estudio define TLR9 como una molécula de reconocimiento importante, y altamente relevante *in vivo*, para poxvirus. En gran medida, proporciona evidencia para el uso de MVA-BN como una manera para intervención inmediata y terapéutica contra potencial infección por poxvirus fatal en individuos sanos así como inmunocomprometidos.

45 Es un objeto más de la presente descripción usar un poxvirus recombinante, incluyendo, pero no limitado a un virus MVA, que puede servir como un vector de expresión eficaz y excepcionalmente seguro. La descripción se refiere a virus MVA recombinantes que contienen un gen que codifica un antígeno extraño, preferiblemente un agente patógeno, y vacunas que contienen dicho virus en una forma fisiológicamente aceptable. La descripción también se refiere a métodos para la preparación de dichos virus vaccinia o vacunas de MVA recombinante y al uso de estas vacunas para la profilaxis de infecciones causadas por dichos agentes patógenos.

Los virus de MVA de acuerdo con la descripción también pueden ser polipéptidos heterólogos que expresan MVA recombinante. Una construcción de ADN, que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido extraño

flanqueado por secuencias de ADN de MVA adyacentes a una supresión que se encuentra en la naturaleza, por ejemplo, Delección II o un IGR, dentro del genoma de MVA, se puede introducir en células infectadas con MVA, para permitir la recombinación homóloga. Una vez que la construcción de ADN ha sido introducida en la célula eucariota y el ADN extraño se ha recombinado con el ADN vírico, es posible aislar el virus vaccinia recombinante deseado de una manera conocida de por sí, preferiblemente con la ayuda de un marcador (comparar Nakano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 1.593-1.596 (1.982); Franke et al., Mol. Cell. Biol., 1.918-1.924 (1.985); Chakrabarti et al., Mol. Cell. Biol., 3.403-3.409 (1.985); Fathi et al., Virology 97-105 (1.986)).

En ratones inmunocompetentes MVA puede proteger de manera inmediata a los ratones contra el virus de la viruela de los ratones Ectromelia (> 47 x LD50).

10 El MVA puede inducir respuestas inmunitarias en células dendríticas vía TLR9 y además por rutas independientes de TLR9. Poxvirus patógenos como el virus Ectromelia por contraste inhiben con eficacia el reconocimiento independiente de TLR9 y dependen así de TLR9 para reconocimiento.

Los ratones inmunocomprometidos que carecen de TLR9 (TLR9-KO) pueden tener una susceptibilidad 100 veces mayor para infección con Ectromelia.

15 El MVA puede proteger de manera inmediata a los ratones de TLR9-KO contra el poxvirus de los ratones Ectromelia (> 500 x LD50).

El MVA puede proteger a ratones inmunocomprometidos (que carecen de capacidad de respuesta a IFN-I) contra exposición baja a intermedia con virus Ectromelia (24 a 25 ratones sobrevivieron a una exposición mortal de otro modo a Ectromelia con 1E+02 o 1E+03).

20 La protección conseguida por sólo una aplicación de MVA puede ser de larga duración. Después de 9 semanas, aún hay protección contra infección de primer momento con Ectromelia (> 500 x LD50).

Los ejemplos detallados que siguen se destinan a contribuir a una mejor comprensión de la presente invención. Sin embargo, la invención no está limitada por los ejemplos.

25 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención descrita en la presente memoria. Se desea que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solamente como ejemplares, estando indicado el alcance de la invención por las siguientes reivindicaciones.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos que caen dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan como ilustrativos de la invención. Cualquier otro ejemplo se proporciona para información solamente. Se entenderá por un experto en la materia que los ejemplos proporcionados de ningún modo se pueden interpretar de manera que limiten la aplicabilidad de la tecnología proporcionada por la presente invención a estos ejemplos.

Ejemplo 1. Métodos experimentales

35 La siguiente sección es un resumen de aquellos métodos usados en todos los Ejemplos descritos en la presente memoria.

Modelo animal

Se adquirieron ratones C57BL/6J de Harlan Winkelmann (Borchen, Alemania). Se generaron ratones deficientes en TLR9 con antecedentes 129/Sv y se retrocruzaron para C57BL/6 durante al menos 8 generaciones como se describe (Hemmi, H. et al., Nature 408, 740-745 (2.000); Hochrein, H. et al.). Tanto las cepas de ratones 129/Sv así como C57BL/6 se considera que muestran una resistencia relativamente alta a infección con ECTV (Tschärke et al., J. Exp. Med. 201: 95-104 (2.005)). Sin embargo, para excluir que en el modelo de infección los antecedentes de la cepa tendrían ratones de influencia sobre los antecedentes de 129/Sv se infectaron con ECTV i. n. y se encontró que por supuesto mostraban el fenotipo resistente relativo observado en ratones C57BL/6, por ejemplo, ninguno de los ratones murió con la dosis de 1E+02 TGID50 y la mayoría de los ratones incluso sobrevivió a una dosis de 3E+03. Se obtuvieron originalmente ratones deficientes en IFN-I-R (A129) ratones obtenidos de Dr. Michel Aguet (Universidad de Zurich) (Muller, U. et al., Science 264, 1.918-1.921 (1.994)) y se retrocruzaron a ratones C57BL/6 durante 8 generaciones. Se adquirieron ratones deficientes en RAG-1 de los laboratorios Jackson y se criaron en la instalación de animales en Zurich.

Virus

50 El MVA usado para este estudio fue MVA-BN®, desarrollado por Bavarian Nordic y depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) (V00083008). El MVA se propagó y se tituló sobre fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF) que se prepararon a partir de huevos de gallina sin patógenos embrionados de 11 días (Charles River, Massachusetts, USA) y se cultivaron en medio RPMI-1640 enriquecido con FCS al 10%. Fueron

proporcionados amablemente CVA y CNPV por el Prof. A. Mayr, Facultad de Veterinaria, Munich, Alemania y se propagaron y se titularon sobre CEF. Se obtuvieron la cepa de ECTV Moscow y la cepa de CPXV Brighton de la Colección de Cultivos Tipo Americanos (ATCC) como VR-1372 y VR-302, respectivamente, y se propagaron y se titularon sobre células Vero C1008 (ECACC 85020206). Se obtuvo SFV de ATCC (VR-364) y se propagó y se tituló sobre la estirpe celular de córnea de conejo SIRC obtenida de ATCC (CCL-60).

Todas las estirpes celulares fueron mantenidas en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) enriquecido con FCS al 10% sin antibióticos. Todos los virus usados en los experimentos de animales fueron purificados dos veces por almohadilla de sacarosa. Para la inactivación UV de los virus stocks de virus concentrados fueron irradiados con ultravioleta con una cámara UV (Genelinker GS, Bio-Rad laboratories, Munich Alemania) durante 15 minutos en condiciones de esterilización. Este tratamiento redujo la eficacia de la transducción de virus recombinantes por debajo de 2% de la actividad del virus original.

Experimentos in vitro

Se generaron DC dependientes del ligando Flt3 generadas in vitro (FL-DC) y se clasificaron esencialmente como se describió previamente (Hochrein, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 101, 11.416-11.421 (2.004)). En resumen, se cultivaron células de médula ósea en presencia de FL recombinante de murina durante ocho días. Las células resultantes fueron >90% CD1 1c positivas y 20 - 60% de las células mostraron fenotipo plasmacitoide (CD1 1c^{pos}CD45RA^{alto}B220^{alto}CD1 1b^{bajo}). Se usaron FL-DC no separadas o clasificadas en pDC y cDC usando un instrumento FACS Aria (BD Bioscience). Se generaron GM-DC generadas in vitro por cultivo de células de médula ósea en presencia de GM-CSF recombinantes de murina (Tebu-bio, Offenbach, Alemania) como se describe (Hochrein, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 101, 11.416-11.421 (2.004)). Se tiñeron las células con anticuerpos específicos para CD1 1c, B220, CD40 y CD69 (BD Biosciences). Se incluyó yoduro de propidio (1 µg/ml) en el lavado final para etiquetar células muertas. Se realizaron análisis de citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Bioscience) y se analizó con software Weasel (El Instituto Walter and Eliza Hall para Investigación Médica, Melbourne, Australia). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular 18-24 horas después de incubación con los virus como se indica o con CpG-2216 (0,5 µM o 1 µM) como control en presencia de IL-3 y GM-CSF y se midió la secreción de IFN- γ e IL-6 usando reactivos ELISA comercialmente disponibles como se describió previamente (Hochrein, H. et al. (2.004)).

Experimentos in vivo y estadística

Se anestesiaron ratones con ketamina/xilamina y se aplicaron virus por instalación gota a gota i. n. en un volumen total de 50 µl. Se aplicaron diluciones de ECTV como se indica solas o junto con MVA 1E+08 TCID₅₀. Se realizaron inyecciones subcutáneas en la región inguinal aplicando una cantidad total de 1E+08 de TCID₅₀ de MVA o una cantidad correspondiente de CVA inactivado por UV inyectando 2 veces un volumen de 250 µl cada uno. Se comprobó el estado de salud de los ratones infectados al menos diariamente y se sometió a eutanasia a los animales con síntomas graves de enfermedad o pérdida de peso que excedía de 25%. Para la determinación de respuestas de células T CD8⁺ específicas de poxvirus se infectaron ratones sin manipular o deficientes en TLR9 por vía intravenosa con MVA de 5E+07 de TCID₅₀ o 1E+08 de TCID₅₀. Se recogieron los bazos 7 días después de la inmunización y se prepararon suspensiones de células únicas rompiendo de manera mecánica los órganos por un filtro de 70 µm. Se trataron las células de bazo y los linfocitos de sangre periférica (PBL, por sus siglas en inglés) con tampón de lisis de glóbulos rojos (NH₄Cl 0,14 M y Tris-HCl 0,017 M, pH 7,2), se lavaron dos veces y se analizaron. Se tiñeron las células con Pentámeros H-2Kb Pro5[®] (Prolimmune, Oxford, RU) cargados con el péptido B8R inmunodominante TSYKFESV (Tscharke et al., J. Exp. Med. 201 : 95-104 (2.005)). Se realizó tinción de pentámero junto con anticuerpos anti-CD8, anti-CD 19 y anti-NK1 1 según el protocolo del fabricante. Para tinción de citocina intracelular se estimularon suspensiones de células durante 5 h con 1 µg/ml de péptido B8R en presencia de 1 µg/ml de GolgiPlug (BD Biosciences). Después, se tiñeron superficialmente las células con anti-CD8 y después se fijaron/permeabilizaron de manera simultánea con el Estuche BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) y se tiñeron finalmente con anticuerpos dirigidos contra IFN- α , TNF-I e IL-2. Los anticuerpos específicos de poxvirus en sueros se midieron mediante ELISA usando extracto bruto de MVA como antígeno y un oveja-anti-ratón -IgG-HRP (Serotec, Alemania) como anticuerpo de detección. Todos los experimentos de animales fueron homologados por el gobierno de Bavaria. Para el cálculo del LD₅₀, se usó el método de Spearman-Kärber.

Ejemplo 2: Inactivación de VACV, CPXV y ECTV pero no de MVA, CNPV y SFV aumenta la maduración de DC.

Se ha descrito previamente que varias cepas de VACV inhiben la maduración de cDC mientras que la maduración tuvo lugar como respuesta a MVA (Engelmayer et al., J. Immunol. 163: 6.762-6.768 (1.999); Drilien et al., J. Gen. Virol. 85: 2.167-2.175 (2.004)). Puesto que estos estudios analizaron sólo la función de cDC en ausencia de pDC se emplearon DC de murina generadas por ligando Flt3 (FL), que consisten en DC que se parece estrechamente a cDC y pDC de bazo de ratón ex-vivo (Naik et al., J. Immunol. 174: 6.592-6.597 (2.005)), para examinar la activación de ambos tipos de DC. Para ensayar si diferentes actividades estimuladoras de diferente VACV eran debidas a ausencia de estímulo o inhibición activa por un componente codificado por el virus, se incubaron FL-DC con diversas cepas diferentes de poxvirus como virus activo o después de inactivación por UV. La activación de DC como respuesta a VACV cepa Ankara (CVA), ECTV y CPXV se multiplicó después de inactivación vírica por UV comparado con la activación de DC como respuesta a virus activos (Fig. 1a). Estos datos iniciales indicaron que un

componente inhibitorio, actuando sobre DC, fue fabricado por esos virus. Por el contrario, la activación de DC cuando se midió por la regulación hacia arriba de CD40, CD69 y CD86 como respuesta a MVA así como (todos por sus siglas en inglés) el virus de la viruela de los canarios (CNPV) y virus del fibroma de Shope del conejo (SFV) no se aumentó después de inactivación por UV (Fig. 1b y datos no mostrados), que sugiere que estos virus carecían de un componente inhibitorio activo. Aparte de maduración de DC, la producción de citocinas incluyendo IFN- α e IL-6 aumentó después de la inactivación UV de CVA, ECTV y CPXV pero no de MVA, CNPV y SFV, sugiriendo una amplia inhibición del reconocimiento vírico y la función de las DC, no restringida a maduración.

Ejemplo 3: El reconocimiento de CVA y ECTV pero no de MVA depende exclusivamente de TLR9.

Previamente se ha demostrado que los virus ADNds como herpesvirus o adenovirus podían ser reconocidos por rutas de reconocimiento dependientes de TLR9 así como independientes de TLR9 (Basner-Tschakarjan et al., J. Gene Med. 8: 1.300-1.306 (2.006); Hochrein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 11.416-11.421 (2.004)). Para elucidar la función de TLR9 en el reconocimiento de poxvirus se generaron FL-DC de animales sin manipular o deficientes en TLR9. En ausencia de TLR9, DC no maduraron significativamente en respuesta a CVA o ECTV activo, cuando se controla por la ausencia de regulación hacia arriba de CD40 y CD69, que indica una fuerte dependencia de TLR9 para el reconocimiento de estos virus. Sin embargo, en ausencia de TLR9 MVA indujo regulación hacia arriba robusta de CD69 pero una regulación hacia arriba drásticamente reducida de CD40 (Fig 2a), que sugiere que la respuesta a MVA se basa en casos de reconocimiento tanto independientes de TLR9 como dependientes de TLR9.

FL-DC contienen tanto pDC, conocidas como el único tipo de células que producen grandes cantidades de IFN- α como respuesta a activación de TLR9, y cDC, que se sabe que es incapaz de producir producción de IFN- α a gran escala como respuesta a TLR9. Se incubaron FL-DC de ratones sin manipular y deficientes en TLR9 con MVA activo y se produjeron cantidades robustas dependientes de la dosis de IFN- α e IL-6 que demuestra la existencia de una ruta de reconocimiento independiente de TLR9 para MVA (Fig. 2b). Sin embargo, MVA inactivado por UV indujo IFN- α e IL-6 solamente en FL-DC de tipo natural pero no deficiente en TLR9, que refuerza la noción sugerida por los datos de maduración, que el reconocimiento de MVA también empleó un componente dependiente de TLR9 (Fig. 2b).

Las DC generadas in vitro con GM-C SF dieron como resultado una población de DC (GM-DC) de sólo cDC que era capaz de producir IFN- α como respuesta a virus ADN activos (por ejemplo, virus del Herpes simplex (HSV, por sus siglas en inglés)) pero no a virus inactivados o CpG-ODN (Hochrein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 11.416-11.421 (2.004)). La incubación de GM-DC con MVA activo indujo IFN- α y producción de IL-6 en células de cepa natural y deficientes en TLR9, que demuestra el reconocimiento independiente de TLR9 de MVA activo. No se detectó producción de IFN- α y no IL-6 por encima de niveles constitutivos producidos después de la incubación con MVA inactivado por UV (Fig. 2c) que potencialmente indica que el reconocimiento dependiente de TLR9 como respuesta a MVA no es funcional en esas células.

Ejemplo 4: El reconocimiento de ECTV pero no de MVA depende exclusivamente de TLR9 y pDC

Para definir los perfiles de activación individuales de los dos subgrupos de DC primarias entre las FL-DC se clasificaron pDC y cDC, se infectaron con ECTV y MVA, y se midió la producción de IFN- α e IL-6. pDC de cepa natural produjo IFN- α para ambos ECTV y MVA y muy poco IL-6 para ECTV. Sin embargo, cDC o pDC deficiente en TLR9 sólo produjo IFN- α como respuesta a MVA pero no ECTV (Fig. 2d). Las cDC de cepa natural y deficientes en TLR9 también produjeron grandes cantidades de IL-6 como respuesta a MVA pero no para ECTV. Estos resultados refuerzan las observaciones obtenidas con la maduración de DC (Fig. 2a) y demuestran que el reconocimiento eficaz de ECTV depende de la presencia de TLR9, y en particular que la producción de IFN- α por ECTV depende de pDC. ECTV inhibe claramente el reconocimiento por otras rutas independientes de TLR9. Por otra parte, el reconocimiento de MVA por ambos pDC y cDC está constituido por un mecanismo independiente de TLR9 adicional.

Para analizar poblaciones de células que contienen pDC aisladas ex vivo además de FL-DC generadas in vitro, se estimularon células de médula ósea totales de cepa natural y deficientes en TLR9, una fuente rica en pDC in vivo, con MVA activo o inactivado por UV en paralelo a CpG-ODN como un control. Similar a los resultados con FL-DC, la producción de IFN- α robusta inducida por MVA activo en células de médula ósea de cepa natural y deficientes en TLR9, mientras con la ausencia de TLR9 la producción de IFN- α como respuesta a MVA inactivado por UV y CpG-ODN se anuló completamente (Fig. 2e). Así, estos datos demostraron que MVA era reconocido por células de médula ósea aisladas recientemente por una ruta independiente de TLR9 sensible a UV y una ruta dependiente de TLR9.

Ejemplo 5: Los ratones deficientes en TLR9 presentan una susceptibilidad drásticamente aumentada a infección por ECTV.

Informes previos han demostrado claramente el reconocimiento de virus ADN por TLR9 in vitro pero la relevancia in vivo de TLR9 para la supervivencia de los ratones es menos clara. Los ratones deficientes en TLR9 no mostraron diferencia en supervivencia en modelos de infección usando HSV o, diferencias de supervivencia limitadas dentro de un intervalo estrecho, en modelos de infección usando citomegalovirus de ratón (MCMV) (Krug et al., Blood 103:

1.433-1.437 (2.004); Tabeta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 3.516-3.521 (2.004); Delale et al., J. Immunol. 175: 6.723-6.732 (2.005)). Dada la fuerte supresión de reconocimiento independiente de TLR9 in vitro por poxvirus como ECTV (Fig. 1, Fig. 2), se formuló la hipótesis de que TLR9 sería un factor importante para la supervivencia de infección con estos virus. Para ensayar esto, se usó un modelo de infección de ratones que imitaba tan estrechamente como era posible una infección por viruela humana: un modelo de infección por ECTV por la ruta intranasal. Similar a infección por VARV en seres humanos, ECTV es altamente específico de la especie y es un patógeno de ratón natural, capaz de infectar de manera eficaz por el tracto respiratorio después de exposición a sólo pequeña dosis víricas. Además, lleva un gran panel de moléculas inmunosupresoras similares a VARV (Esteban, D. J., y Buller, R. M., J. Gen. Virol. 86: 2.645-2.659 (2.005)).

Los experimentos iniciales usando dosis relativamente altas de ECTV ($1E+04$ de dosis infectivas de cultivo de tejido ($TCID_{50}$)) demostraron que los ratones deficientes en TLR9 morían al menos 2 días más temprano que los ratones sin manipular. Para evaluar la susceptibilidad y cuantificar el LD_{50} se infectaron ratones deficientes en TLR9 y sin manipular con dosis variables de ECTV. Todos los ratones deficientes en TLR9 murieron después de infección con tan poco como $3E+01$ de $TCID_{50}$ mientras que ninguno murió después de inoculación con $1E+01$ de $TCID_{50}$ (Fig. 3b). Por el contrario, ninguno de los ratones sin manipular murió después de infección con $1E+02$ de $TCID_{50}$ y sólo cuando se usó $1E+04$ de $TCID_{50}$ todos los ratones sucumbieron a infección por Ectromelia (Fig. 3a). Hubo alguna variación entre los experimentos con ratones sin manipular usando las dosis de $3E+02$ a $3E+03$ de $TCID_{50}$, que fue parcialmente específico del género, siendo con ratones macho más susceptible que con ratones hembra. Se calculó un LD_{50} de 19 $TCID_{50}$ para los ratones deficientes en TLR9 y un LD_{50} de aproximadamente 2120 $TCID_{50}$ para los ratones sin manipular. Así, los ratones deficientes en TLR9 son más de 100 veces más susceptibles a infección por ECTV que los ratones sin manipular. Por lo tanto, en fuerte acuerdo con los datos in vitro, TLR9 es un componente esencial de la respuesta inmunitaria a infección por ECTV.

Ejemplo 6: El MVA protege inmediatamente a ratones sin manipular y deficientes en TLR9 de exposición a ECTV letal.

Los experimentos in vitro demostraron que el reconocimiento suprimido de manera eficaz por DC, mientras que MVA activó las DC (Fig. 1). Se formuló la hipótesis, por lo tanto, que MVA proporcionado al mismo tiempo que el patógeno activaría al sistema inmunitario y como resultado podía inducir respuestas inmunitarias que controlen potencialmente el poxvirus patógeno. Por supuesto, el MVA proporcionado al mismo tiempo o inmediatamente después de exposición con una dosis alta letal de ECTV de $1E+05$ $TCID_{50}$ protegió completamente a los ratones sin manipular contra la muerte mientras que todos los ratones de control murieron con la dosis 10 veces inferior de $1E+04$ $TCID_{50}$ (Fig. 4).

Puesto que MVA indujo una fuerte activación independiente de TLR9 de células inmunitarias in vitro, a continuación se ensayó si el MVA podría proteger a los ratones deficientes en TLR9 contra infección por ECTV. Similar a la protección observada en ratones sin manipular (Fig. 4), el MVA protegía inmediatamente a los ratones deficientes en TLR9 contra dosis altamente letales de infección por ECTV. Mientras que todos los ratones de control no tratados murieron con $1E+02$ $TCID_{50}$, todos los ratones tratados con MVA incluso sobrevivieron a una exposición con $1E+04$ $TCID_{50}$, que se parece a la dosis que excede 500 veces el LD_{50} para ratones deficientes en TLR9 (Fig. 5). Se observó que los ratones deficientes en TLR9 expuestos a dosis altas de ECTV ($3E+03$ y $1E+04$ $TCID_{50}$) desarrollaron lesiones en la cola después de 2-3 semanas que desaparecieron después de 4 semanas. Las lesiones de la cola en ratones deficientes en TLR9 sin síntomas de otro modo indicaron que las respuestas inmunitarias inducidas por MVA podían evitar la enfermedad inducida por ECTV severa y la muerte, pero no eliminar completamente el virus en las primeras semanas.

Ejemplo 7: Los ratones pueden ser protegidos contra infección letal por ECTV si se aplica MVA a un sitio diferente.

Para verificar si la protección inmediata en ratones sin manipular y deficientes en TLR9 era completamente dependiente de la administración conjunta de MVA al mismo sitio que la infección por ECTV se expusieron ratones por vía intranasal a una dosis letal de ECTV y se aplicó MVA por una inyección subcutánea. Los ratones deficientes en TLR9 (Fig. 6a) y sin manipular (Fig. 6b) sobrevivieron a infección por ECTV letal, sin ningún signo de enfermedad, si se aplicaba MVA al sitio subcutáneo (Fig. 6). Así la administración conjunta de MVA al mismo sitio que ECTV no fue esencial para la protección inmediata.

Ejemplo 8: Los orthopoxvirus inactivados son menos eficaces que MVA en la protección de infección con ECN letal.

Nuestros experimentos in vitro han sugerido que los orthopoxvirus inactivados por UV actúan como agonistas exclusivos de TLR9 pero han perdido su capacidad para estimular vía una manera independiente de TLR9 (Fig. 2). Para ensayar si esta estimulación "TLR-9 sólo" en presencia de antígeno de orthopoxvirus ascendería cualquier protección se expusieron ratones sin manipular con una dosis letal de ECTV y se aplicó por vía subcutánea el equivalente de $1E+08$ $TCID_{50}$ de un CVA inactivado por UV. De los 5 ratones expuestos uno murió el día 11 mientras que los otros sobrevivieron (Fig. 6b). Sin embargo, al contrario que los ratones que recibieron la misma dosis de MVA activo por vía subcutánea, todos los ratones tratados con CVA inactivado mostraron fuerte signos de enfermedad incluyendo letargo y desarrollaron lesiones en la cola que se curaron sólo en la 4ª semana de la exposición. Así los orthopoxvirus inactivados, aunque proporcionando antígeno vírico y potencial ligando de TLR9,

parecen inducir una protección que es inferior a la protección robusta conseguida con MVA activo.

Ejemplo 9: La protección inmediata mediada por MVA a partir de exposición a ECTV letal es parcialmente independiente de IFN-I.

5 Para elucidar si la administración de MVA era capaz de proteger inmediatamente a otros ratones inmunocomprometidos y dar luz sobre el mecanismo de protección se realizaron experimentos con ratones deficientes en receptor de IFN-I (IFN-I-R), que se sabía que eran altamente susceptibles de infecciones víricas graves incluyendo infecciones por poxvirus (26). Los experimentos iniciales demostraron que similar a los ratones deficientes en TLR9 todos los ratones deficientes en IFN-I-R murieron después de exposición a $1E+02$ TCID₅₀ de ECTV. Puesto que la producción de IFN- α in vitro para ECTV pero no para MVA era dependiente de TLR9, se formuló la hipótesis de que IFN- α inducido por MVA era una parte esencial de la protección inmediata en ratones deficientes en TLR9. Sin embargo, mientras que los ratones deficientes en IFN-I-R de control, no tratados, murieron con una exposición a $1E+02$ TCID₅₀ de ECTV en 10 días, el tratamiento con MVA inmediato protegía sorprendentemente a los ratones deficientes en IFN-I-R contra una exposición a $1E+02$ y $1E+03$ TCID₅₀ de ECTV (Fig. 7). A partir de un total de 15 IFN-I-R se estimularon ratones con $1E+02$ TCID₅₀ de ECTV, un ratón desarrolló una extremidad hinchada y tuvo que ser sometido a eutanasia después de 3 semanas por razones éticas, mientras que los otros 14 ratones y los 10 ratones expuestos a $1E+03$ ECTV no presentaron síntomas durante más de 4 semanas. Sin embargo con dosis mayores de ECTV la protección de ratones deficientes en IFN-I-R fue mucho menos robusta. Aproximadamente la mitad de los ratones IFN-I-R expuestos a $1E+04$ ECTV murió y todos los ratones IFN-I-R expuestos a $1E+05$ ECTV murieron (Fig. 7). Puesto que estas dosis más altas correspondían a exposiciones víricas a las que los ratones sin manipular con los mismos antecedentes podían sobrevivir en presencia de MVA, se concluyó que un mecanismo de la protección inmediata vía MVA está mediado por IFN-I. Sin embargo, algo de protección está claramente mediada por mecanismos independientes de IFN-I puesto que MVA podría proteger a los ratones contra dosis bajas e intermedias de infección por ECTV letal incluso en ausencia de un sistema funcional de IFN-I.

25 Ejemplo 10: La protección inmediata vía MVA en infección por ECTV depende de las respuestas inmunitarias adaptativas.

Se sabe que MVA induce fuertes respuestas inmunitarias adaptativas incluyendo respuestas de células T citotóxicas (CTL) y formación de anticuerpos que contribuyen ambas a la protección contra orthopoxvirus patógenos (Wyatt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 4.590-459.5 (2.004)). Previamente, se ha demostrado que los ratones deficientes en TLR9 son capaces de aumentar CTL estable y las respuestas de anticuerpos con la vacunación de ADN, demostrándose así la capacidad completa de estos ratones para aumentar las respuestas inmunitarias adaptativas sólidas (Spies et al., J. Immunol. 171: 5.908-5.912 (2.003); Babiuk et al.; Immunology 113: 114-120 (2.004)).

35 Para ensayar si la ausencia de TLR9 afectaría a las respuestas inmunitarias adaptativas a poxvirus, se aplicó MVA y se midieron los anticuerpos a poxvirus por ELISA en el suero y respuestas de CTL específicas de poxvirus por tinción de pentámero para B8R en células de bazo y células de sangre periférica. Los ratones deficientes en TLR9 aumentaron las respuestas de anticuerpos específicos de poxvirus robustos y CTL indicando que las respuestas inmunitarias adaptativas como respuesta a vacunación con MVA no dependen de la presencia de TLR9.

40 Se investigó a continuación si las respuestas inmunitarias adaptativas medidas se traducirían en protección de larga duración a infección por ECTV, así si la protección inducida por MVA en ratones deficientes en TLR9 no era sólo inmediata (Fig. 5), sino también de larga duración. Nueve semanas después de la exposición inicial, los ratones deficientes en TLR9 de los experimentos descritos anteriormente (Fig. 5) y además los ratones que habían recibido MVA sólo nueve semanas más temprano se volvieron a exponer usando $1E+04$ TCID₅₀ de ECTV. Todos los ratones deficientes en TLR9 que habían recibido una dosis única de MVA nueve semanas más temprano bien sola o junto con ECTV sobrevivieron a la exposición con $1E+04$ TCID₅₀ de ECTV. Como se observó con la protección inmediata, la protección de larga duración de los ratones deficientes en TLR9 después de tratamiento con MVA excedió de un factor de 500 del LD₅₀. Estos experimentos demostraron que los ratones deficientes en TLR9 eran capaces de aumentar y sostener la inmunidad protectora sustancial a infección por poxvirus en la vacunación tradicional con MVA que lo más probablemente dependía de respuestas inmunitarias adaptativas.

50 Para probar la función de las respuestas inmunitarias adaptativas en el protocolo de protección inmediata se expusieron ratones deficientes en Rag-1 a ECTV en presencia o ausencia de MVA (Fig. 8). Los ratones deficientes en Rag-1 carecían de células B y células T maduras y así eran incapaces de producir anticuerpos y CTL, sin administración conjunta de MVA los ratones deficientes en Rag-1 morían rápidamente como respuesta a una exposición con ECTV ($1E+02$ y $1E+03$). El tratamiento conjunto con MVA extendió la supervivencia de los ratones de Rag-1 durante varios días, pero finalmente todos los ratones murieron, demostrando que las respuestas inmunitarias adaptativas eran por supuesto cruciales para la supervivencia de ECTV, incluso en presencia de MVA aplicado inmediatamente.

Ejemplo 11: El MVA salva completamente a los ratones deficientes en TLR9 si se aplicaba dos días después de infección con ECTV.

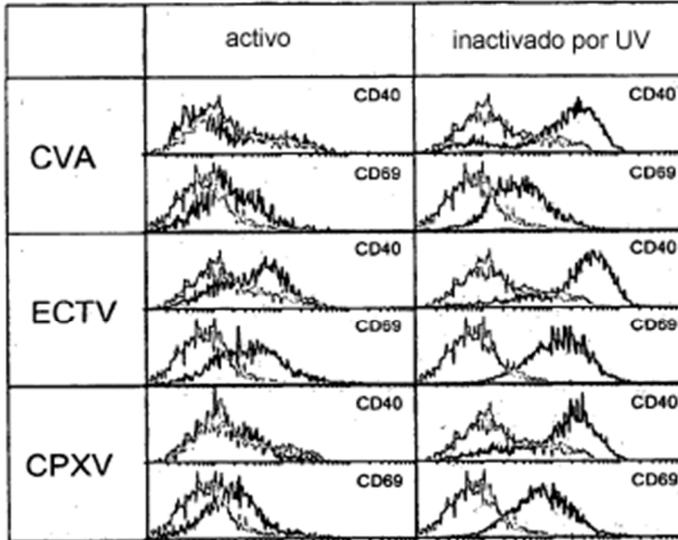
- La recomendación WHO en casos de infección por viruela incluye la vacunación tan rápido como sea posible después de la exposición. Sin embargo, existe sólo información histórica anecdótica acerca del éxito de la vacunación post-exposición contra la viruela y en la mayoría de los casos el estado de vacunación previa de los individuos no estuvo claro. (Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., & Ladnyi, I. D. Smallpox and its eradication. (Geneva: Organización Mundial de la Salud; 1.988); Mortimer, P. P., Clin. Infect. Dis. 36, 622-629 (2.003)). Por otra parte, en modelos animales no se observó beneficio de supervivencia significativo a la vacunación post-exposición usando como modelos de infección el MPXV en simios o VACV en ratones (Stittelaar et al., Nature 439: 745-748 (2.006); Staib et al., J. Gen. Virol. 87: 2.917-2.921 (2.006)). De esta manera, los resultados de la invención actual son inesperados.
- 5
- 10 Dado este supuesto y el hecho de que el modelo de infección intranasal de ECTV se considera como un modelo animal bueno para infección por viruela en seres humanos (Esteban, D. J., y Buller, R. M., J. Gen. Virol. 86: 2.645-2.659 (2.005)), se analizó si la protección inmediata robusta contra una infección letal por ECTV por MVA se podía extender a una intervención post-exposición terapéutica con MVA. Como se muestra en la figura 9, MVA dado hasta dos días después de exposición a una dosis letal de ECTV, protegía completamente a los ratones deficientes en
- 15 TLR9 contra la muerte sin síntomas obvios de enfermedad (Fig. 9 y datos no mostrados). Algunos ratones en el grupo que recibieron tratamiento con MVA tan tardío como 3 días después de una dosis letal de ECTV también sobrevivieron (Fig. 9b). Estos datos muestran protección contra la muerte para infección por orthopoxvirus específicos de la especie usando como un tratamiento post-exposición.

REIVINDICACIONES

1. Un poxvirus para uso para proteger a un ser humano contra la viruela después de exposición a ella, en el que una composición inmunogénica que comprende dicho poxvirus se tiene que administrar al ser humano entre 0 y 72 horas después de exposición a viruela, en el que dicho poxvirus es un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).
- 5 2. Una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un poxvirus para uso para proteger a un ser humano contra la viruela después de exposición a ella, en el que dicha composición inmunogénica o vacuna se tiene que administrar al ser humano entre 0 y 72 horas después de exposición a viruela, en la que dicho poxvirus es un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).
- 10 3. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según la reivindicación 1 ó 2, en que la composición inmunogénica, vacuna o poxvirus se administra a dicho ser humano entre 0 y 48 horas después de infección con el poxvirus.
4. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el MVA es una cepa **caracterizada por** al menos una de las siguientes propiedades:
 - 15 (i) capacidad de replicación reproductiva *in vitro* en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero no capacidad de replicación reproductiva en una estirpe celular humana, como en la estirpe celular de queratinocitos humana HaCaT, la estirpe celular 293 de riñón de embrión humano, la estirpe celular 143B de osteosarcoma óseo humano y la estirpe celular de adenocarcinoma de cérvix humano HeLa;
 - (ii) fracaso en la replicación en un modelo de ratón que es incapaz de producir células B y T maduras y como tal está seriamente inmunocomprometido y es altamente susceptible de un virus que se replica e
 - 20 (iii) inducción de al menos el mismo nivel de respuesta inmunitaria específica en regímenes de cebado de virus vaccinia/de refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con regímenes de cebado con ADN/de refuerzo de virus vaccinia.
- 25 5. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el MVA se tiene que administrar en una dosis de 10^5 a 5×10^8 TCID₅₀, preferiblemente en una dosis de 10^7 a 5×10^8 TCID₅₀.
6. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el MVA es la cepa como se deposita en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008.
- 30 7. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el MVA es un MVA recombinante.
8. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según la reivindicación 7, en que el MVA comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos que codifica al menos un epítipo antigénico.
9. El poxvirus, la composición inmunogénica o la vacuna para uso según la reivindicación 8, en el que el epítipo antigénico es un epítipo antigénico de un agente infeccioso.
- 35 10. Un poxvirus para uso en un método para vacunar a un ser humano contra la viruela, en el que la vacunación es 0 a 72 horas post-exposición a la viruela, preferiblemente 0 a 48 horas post-exposición a la viruela y en el que dicho poxvirus es la cepa de MVA como se deposita en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008.

Figura 1

a



b

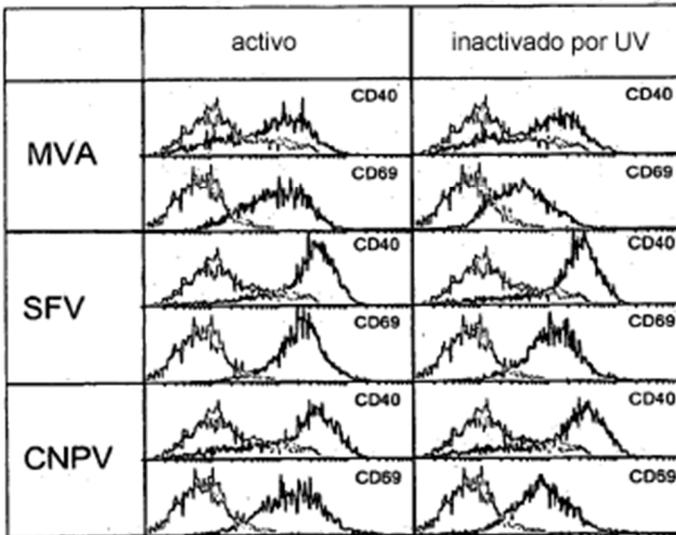


Figura 2

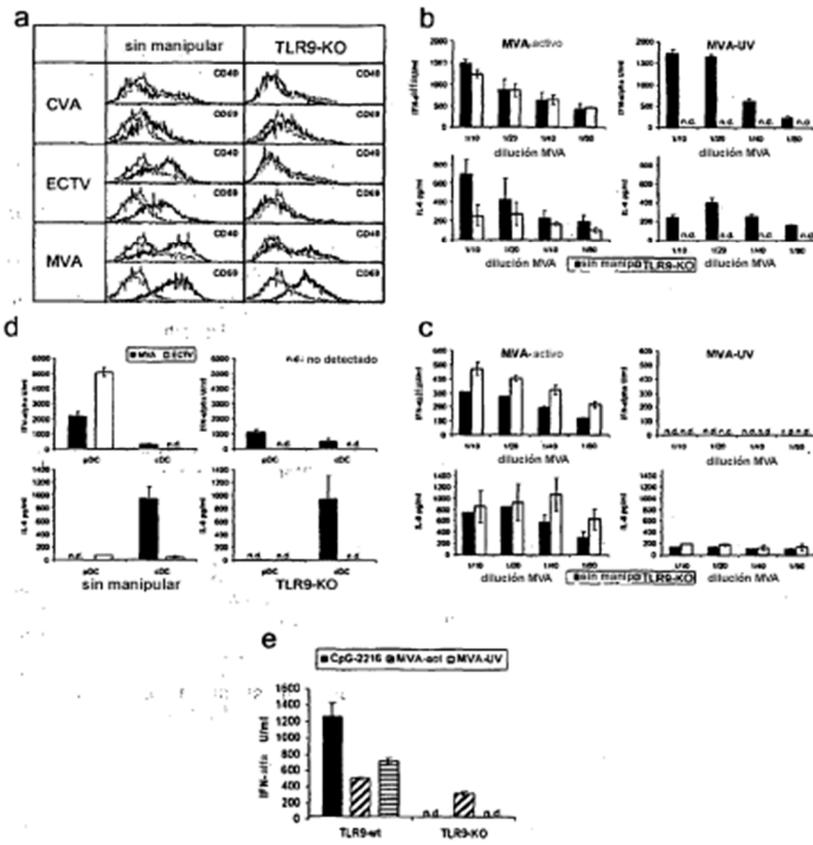


Figura 3

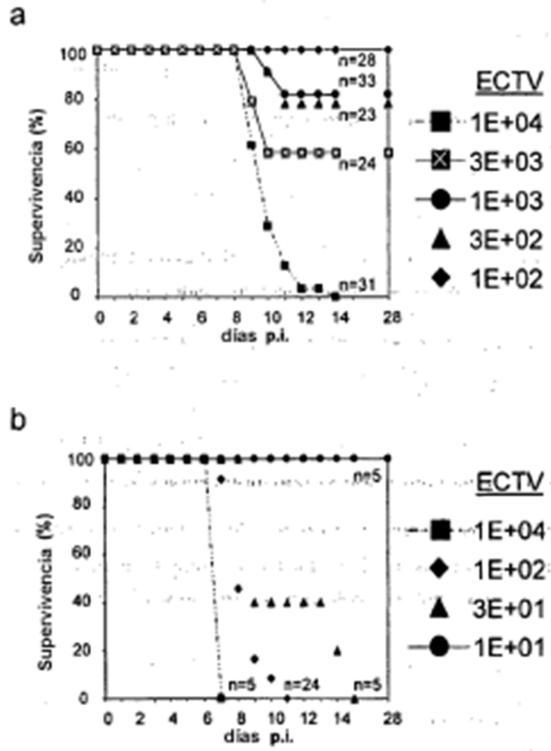


Figura 4

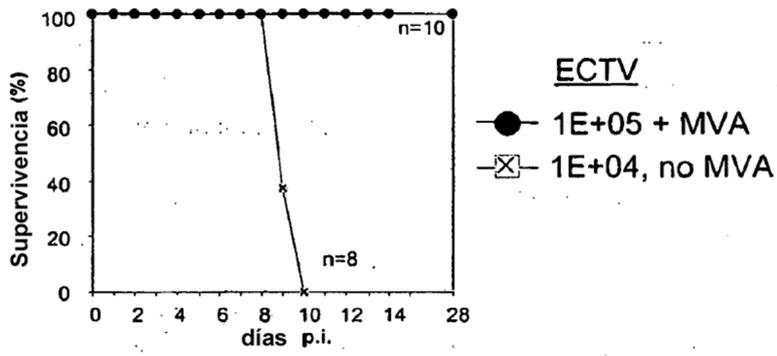


Figura 5

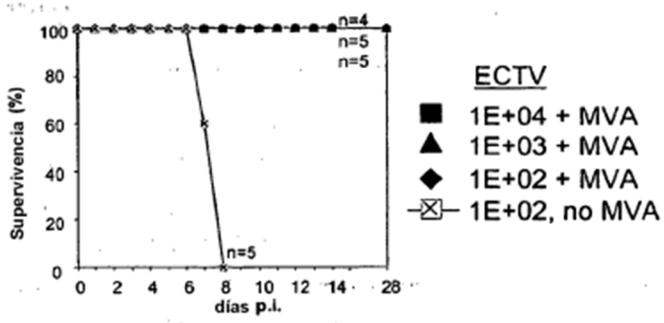
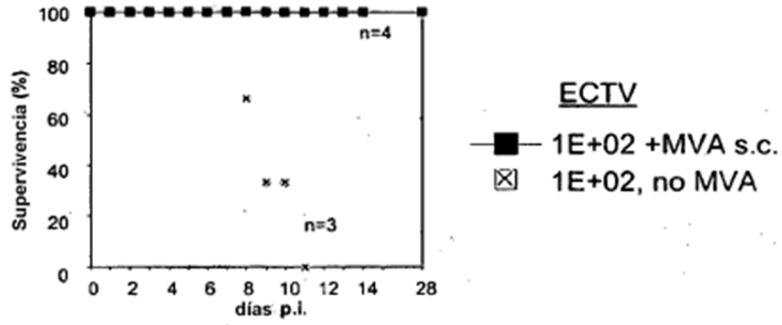


Figura 6

a



b

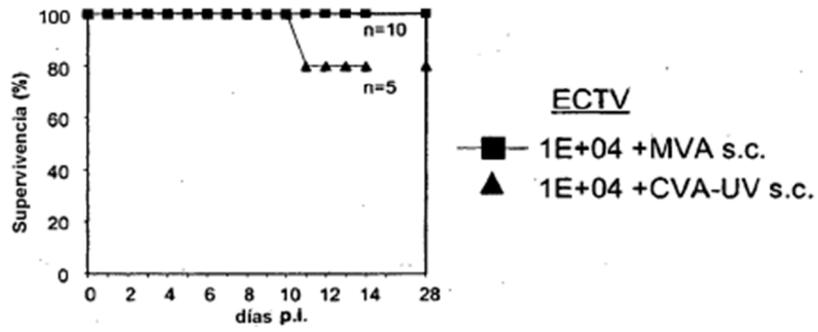


Figura 7

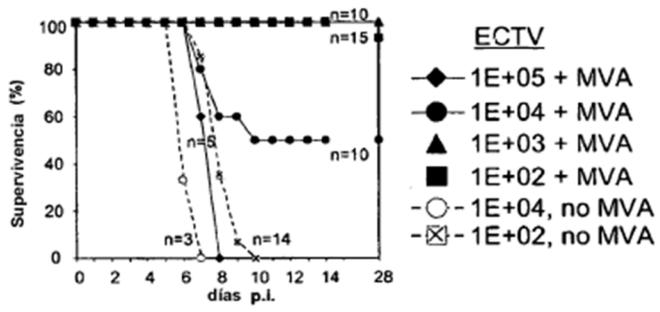


Figura 8

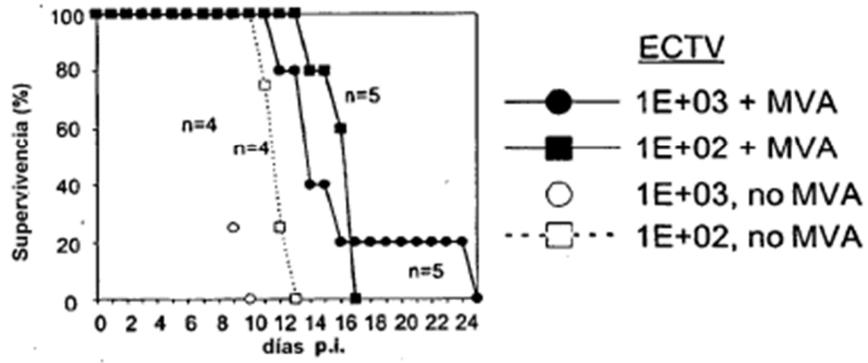


Figura 9

