

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 654**

51 Int. Cl.:

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010 PCT/BR2010/000352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11050431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010 E 10825869 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2495325**

54 Título: **Vacuna de ADN contra el virus de la fiebre amarilla**

30 Prioridad:

27.10.2009 BR PI0905645

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

15.03.2017

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (100.0%)
Avenida Brasil 4365, Manguinhos
21045-900 Rio de Janeiro, RJ, BR**

72 Inventor/es:

**MARQUES, ERNESTO TORRES DE AZEVEDO;
DHALIA, RAFAEL y
MACIEL FILHO, ROMULO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 605 654 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de ADN contra el virus de la fiebre amarilla

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige a una vacuna de ADN que es capaz de realizar la coexpresión de la proteína PreM/ME del virus de la fiebre amarilla junto con LAMP, la proteína de asociación con la membrana lisosómica ("Association Protein to the Lysosomal Membrane"), y presentar dichas proteínas de antígeno al sistema inmunológico a través de la vía de MHC II.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la fiebre amarilla (YFV) se considera el prototipo de la familia *Flaviviridae*, también representada por diversos otros virus de importancia médica que provocan enfermedades graves, tales como el dengue, la encefalitis japonesa y el fiebre del Nilo occidental (Barrett, 2002). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se producen más de 200.000 casos anuales en el mundo de infección por YFV, que incluyen 30.000 muertes (90% de casos diseminados en África). La estrategia más segura para la prevención de la enfermedad sigue siendo la vacunación, ya aún no existe un fármaco eficaz contra la infección por YFV. En los últimos 70 años, más de 400 millones de personas en todo el mundo han sido vacunadas con el virus atenuado de YF (17DD), que se considera muy seguro y eficaz. A pesar del éxito de la vacunación en masa con 17DD, que es capaz de inducir una respuesta duradera de anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T citotóxicas (Poland, Calisher *et al.*, 1981; Reinhardt, Jaspert *et al.*, 1998), en la bibliografía se han indicado sistemáticamente acontecimientos graves adversos (como resultado de la vacunación) [analizado en Liu, 2003]. En algunos casos, la inmunización se ha asociado directamente con un aumento en la gravedad de los síntomas (Monath, Arroyo *et al.*, 2002) e incluso puede conducir a reacciones mortales (Vasconcelos, Luna *et al.*, 2001; Lefevre, Marianneau *et al.*, 2004). En este escenario, el desarrollo de una nueva estrategia de vacunación, tal como las vacunas de ADN que codifican secuencias víricas específicas (Donnelly, Ulmer *et al.*, 1997; Lewis y Babiuk, 1999; Robinson, 1999; Schultz, Pavlovic *et al.*, 2000) reviste una importancia fundamental para el desarrollo de estrategias de vacunas aún más seguras.

15 El genoma de YFV está dispuesto en una molécula de ARNm positiva, de aproximadamente 10,8 Kb, flanqueada por 5 estructuras de "cierre de cadena y 3ª manilla" terminales no poliadeniladas. El ARN de YFV codifica tres genes estructurales (Cápsida - C, Membrana - M, y Envuelta - E) y 7 genes que codifican proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). Durante el ensamblaje del virus, el dominio carboxi-terminal de la proteína C actúa como una secuencia señal para la translocación del precursor PreM/M hacia el lumen del retículo endoplasmático (ER) de la célula hospedante, lo cual permite la maduración apropiada de las proteínas M y E. La coexpresión de las proteínas PreM/M y flavivirus en células de mamífero produce la formación de partículas pseudovíricas capaces de inducir una respuesta humoral (Raviprakash, Kochel *et al.*, 2000; Wu, Li *et al.*, 2006), porque la proteína E es la diana principal para los anticuerpos neutralizantes.

20 Se ha indicado que la coexpresión de las proteínas PreM/M y E, como estrategia de vacuna, es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la encefalitis japonesa y el dengue (Konishi, Yamaoka *et al.*, 1998; Konishi, Yamaoka *et al.*, 2000; Konishi, Ajiro *et al.*, 2003). Sin embargo, estas vacunas no inducen una respuesta a largo plazo de anticuerpos neutralizantes con titulaciones apropiadas (Lu, *et al.*, Raviprakash, 2003). La ineficacia de estas formulaciones probablemente esté relacionada con el mecanismo de presentación de estos antígenos al sistema inmunológico de los hospedantes. La mayoría de los antígenos producidos de modo endógeno, característicos de las vacunas de ADN, son secuestrados y presentados al sistema inmunológico del hospedante por las moléculas de MHC I. Para una respuesta inmunológica satisfactoria con una alta producción de anticuerpos neutralizantes, resulta fundamental que los antígenos sean presentados a las células de tipo T auxiliares CD4⁺ por las moléculas de MHC II. El procesamiento y la presentación de antígenos por MHC II induce la activación de células T CD4⁺ que resulta fundamental para la actuación de las vacunas genéticas, como ya ha sido demostrado en estudios de delección de MHC II (Raviprakash, Marques *et al.*, 2001) y merma de CD4⁺ en ratones (Lu *et al.*, Raviprakash, 2003). La activación de células CD4⁺ resulta fundamental para la inducción de respuestas de CD8⁺, para el desarrollo de células de memoria (Marques, Chikhlikar *et al.*, 2003) y para la expansión clonal de células B específicas de antígeno (De Arruda, Chikhlikar *et al.*, 2004). Para que los antígenos producidos de modo endógeno se dirijan a las moléculas de clase II, y no a las de clase I, es necesario que estas proteínas se fusionen con péptidos señal que las dirijan al compartimento lisosómico de la célula.

25 La posibilidad de dirigir a los antígenos producidos de modo endógeno para su procesamiento a través de MHC II ha aumentado muchísimo después del descubrimiento de una proteína transmembrana de tipo I, denominada proteína de membrana asociada a liposomas ("Lysosome-Associated Membrane Protein", LAMP (Chen, Murphy *et al.*, 1985)). LAMP es una proteína que se une a la membrana externa del lisosoma a través de su secuencia carboxi-terminal YXXØ, presente en una cola citoplásmica de 11 aminoácidos (Guarnieri, Arterburn *et al.*, 1993; Rohrer, Schweizer *et al.*, 1996; Obermüller, Kiecke *et al.*, 2002). El tráfico intracelular de LAMP incluye a los compartimentos multilaminares especializados de células presentadoras de antígenos ("Antigen-Presenting Cells", APC) inmaduras, denominados MIIC y CIIV, en los que tiene lugar el procesamiento y la formación del complejo de péptido antigénico-

MHC II (Kleijmeer, Morkowski *et al.*, 1997; Drake, Lewis *et al.*, 1999; Turley, Inaba *et al.*, 2000). El descubrimiento de la colocalización de las moléculas de LAMP y MHC II permite su uso como soporte de antígenos quiméricos que contengan las secuencias de las dianas LAMP, con el objetivo de dirigir el procesamiento del antígeno al compartimento de MHC II. Muchos trabajos han demostrado que los antígenos fusionados con LAMP (antígeno/LAMP) son capaces de generar una mayor actividad proliferativa de linfocitos específicos de antígenos, unas mayores titulaciones de anticuerpos y una intensa actividad T citotóxica, con relación a los antígenos salvajes no fusionados con LAMP (Rowell, Ruff *et al.*, 1995; Wu, Guarneri *et al.*, 1995; Ruff, Guarneri *et al.*, 1997; Raviprakash, Marques *et al.*, 2001; Su, Vieweg *et al.*, 2002; Donnelly, Berry *et al.*, 2003; Anwar, Chandrasekaran *et al.*, 2005).

La vacuna de virus atenuados 17DD está siendo producida en el campus de Manguinhos - FIOCRUZ/RJ desde 1937, es decir, desde hace al menos 70 años. La inmunización en masa con la vacuna 17DD, así como la lucha sistemática contra el vector de transmisión de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*), han sido y continúan siendo estrategias cruciales para el control de la enfermedad en el país. A pesar de la eficacia y la seguridad de la vacuna 17DD, esta no está recomendada a niños, mujeres embarazadas y personas que presentan inmunodeficiencias y que son alérgicas a las proteínas del huevo (el sustrato para la producción de la vacuna 17DD). Se calcula que aproximadamente 5% de la población presenta alergias y/o efectos secundarios en respuesta a la vacuna, que es posible que culminen en casos raros de muerte provocada por la vacunación.

En fechas recientes, tras la muerte de monos en regiones con vida salvaje en las que circula el YFV, la población ha empezado a tener miedo por las especulaciones de la reintroducción de la fiebre amarilla urbana en las zonas rurales. Tomando en cuenta el riesgo de infección prevalente en las áreas tropicales, la invasión del entorno urbano por el vector de la enfermedad, el calentamiento global y la falta de políticas apropiadas para combatir al insecto vector, no puede descuidarse el riesgo de dispersión de la enfermedad en áreas urbanas. El caos provocado por el dengue en el estado de Río de Janeiro, que, por cierto, es transmitido por el mismo vector que la fiebre amarilla, ilustra el riesgo de un posible brote (aunque improbable) de la fiebre amarilla urbana en las zonas rurales. Tomando en cuenta todos estos factores, el desarrollo de una estrategia de vacuna complementaria y/o alternativa contra la fiebre amarilla puede complementar/sustituir el uso de la versión de la vacuna con virus atenuados.

Aunque no se ha aprobado ninguna vacuna de ADN para su uso en seres humanos, este tipo de tecnología cada vez se estimula más y potencialmente sustituirá a las formulaciones basadas en microorganismos vivos. Las formulaciones con una base de ADN pueden manipularse y dosificarse con facilidad, no requieren condiciones especiales de temperatura para la conservación y la distribución, e incluso eliminan cualquier posible riesgo de infección por parte de los agentes vivos/atenuados. Este tipo de tecnología también permite la manipulación de inmunógenos capaces de estimular al sistema inmunológico con epitopos y señales biológicas específicos, lo cual evita el uso de antígenos/epitopos innecesarios y potencialmente perjudiciales con respecto a posibles respuestas inmunológicas cruzadas (el principal obstáculo para el desarrollo de una vacuna eficaz contra el dengue, debido a la reacción cruzada entre sus 4 serotipos). Por último, con los avances tecnológicos de las herramientas para la manipulación de microorganismos y la purificación de moléculas a gran escala, las vacunas de ADN podrían ser producidas a mayor escala y con un coste final menor cuando se comparan con las formulaciones atenuadas/inactivadas.

Es importante advertir que, ante los resultados significativamente esperanzadores obtenidos por el grupo de los inventores, que han empleado de una vacuna genética basada en la secuencia vírica de la proteína E fusionada con LAMP y han mejorado esta vacuna mediante la optimización de antígenos para la expresión en seres humanos, los inventores creen en la posibilidad de desarrollar y aplicar una vacuna de ADN aún más segura, capaz de conferir inmunidad contra el virus de la fiebre amarilla en seres humanos. Este tipo de tecnología también puede servir de contribución al desarrollo de otras vacunas víricas, en especial contra otros flavivirus, tales como el virus del dengue.

El documento WO 2004/078986 A1 describe pseudopartículas de flavivirus para su uso como vacunas que contienen glicoproteínas prM/E ensambladas sobre partículas centrales retrovíricas.

El documento US 2004/257307 A1 describe vacunas quiméricas que comprenden una secuencia de antígeno fusionada con un dominio para el transporte de la proteína a un compartimento endosómico, por ejemplo, con un dominio del polipéptido LAMP. Estos antígenos pueden ser proteínas procedentes del virus de la fiebre amarilla.

El problema de la presente invención es proporcionar otros antígenos del virus de la fiebre amarilla (YFV) dirigidos al compartimento lisosómico.

Según la presente invención, dicho problema se resuelve fusionando el polipéptido PreM/ME de YFV al dominio C-terminal de LAMP, tal como se especifica en las reivindicaciones.

Sumario de la invención

La presente invención, en su aspecto más amplio, se dirige a una vacuna de ADN optimizada basada en la región que codifica la envuelta del virus de la fiebre amarilla fusionada con la proteína de asociación con la membrana lisosómica (LAMP), que es capaz de procesar el antígeno codificado y presentarlo al sistema inmunológico a través de MHC, según se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras y las tablas

- Figura 1: Representación esquemática de las regiones de asociación para la amplificación de PreM/M-E salvaje (para YFE) y PreM/M-E fusionada con LAMP (pL/YFE). El esquema representa el genoma completo del virus de la fiebre amarilla, compuesto de 3 genes estructurales [Cápsida (C), Membrana (PreM/M) y Envuelta (E)] y 7 genes no estructurales (NS1-NS5). Las flechas negras indican las regiones de asociación de los cebadores (oligonucleótidos) empleados para la amplificación de PreM/M-E salvaje (región carboxi-terminal de la región transmembrana X de la cápsida C-terminal de la envuelta). Para la amplificación de PreM/M-E, para la fusión con LAMP, el cebador "inverso" empleado se diseñó para hibridarse antes de la región transmembrana de la envuelta (flecha blanca).
- Figura 2: Producto de la PCR de PreM/M-E del virus YF. Después de la amplificación mediante PCR empleando cebadores diseñados para la secuencia PreM/M-E salvaje (tabla 1), se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2000 pb, tal como se esperaba. El producto de la PCR indicado migró en un gel de agarosa al 1% y se visualizó con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 1650 y 2000 pares de bases.
- Figura 3: Productos de la PCR de PreM/M-E de YFV para la fusión con LAMP y C-LAMP (humana). Después de la amplificación mediante PCR empleando cebadores diseñados para las secuencias de PreM/M-E para la fusión con LAMP y C-LAMP humana (tabla 1), se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1900 pb (PreM/M-E) y otro de 125 pb (C-LAMP), tal como se esperaba. Estos productos de la PCR migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 100 y 2000 pares de bases.
- Figura 4: Digestión de ADN de plásmido para confirmar la clonación de la secuencia de PreM/M-E salvaje en el vector pGEMT-Easy. Después de la transformación con la conexión pGEMT-Easy + PreM/M-E salvaje, se inocularon 3 clones bacterianos blancos (seleccionados mediante IPTG/X-Gal) en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las minipreparaciones obtenidas después se digirieron con las enzimas XhoI y NotI para confirmar la clonación de PreM/M-E salvaje en el vector pGEMT-Easy. Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 3000 y 2000 pares de bases. Solo el clon 2, asterisco, liberó un fragmento del tamaño esperado (2000 pb).
- Figura 5: Digestión de ADN de plásmido para confirmar la clonación de la secuencia de PreM/M-E para la fusión con LAMP en el vector pGEMT-Easy. Después de la transformación con la conexión pGEMT-Easy + PreM/ME para la fusión con LAMP, se inocularon 8 clones bacterianos blancos (seleccionados mediante IPTG/X-Gal) en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las minipreparaciones obtenidas después se digirieron con las enzimas NheI y XhoI para confirmar la clonación de PreM/M-E para la fusión con LAMP en el vector pGEMT-Easy. Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 1650 y 2000 pares de bases. Los clones 3, 5 y 8 (asteriscos) liberaron fragmentos del tamaño esperado (1900 pb).
- Figura 6: Digestión de ADN de plásmido para confirmar la clonación de C-LAMP en el vector pGEMT-Easy. Después de la transformación con la conexión pGEMT-Easy + C-LAMP, se inocularon 3 clones bacterianos en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las minipreparaciones obtenidas después se digirieron con las enzimas XhoI y XbaI para confirmar la clonación de C-LAMP en el vector pGEMT-Easy. Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 100 y 3000 pares de bases. Del total de 3 clones, todos liberaron fragmentos del tamaño esperado (125 pb, asteriscos).
- Figura 7: Digestión de ADN de plásmido para confirmar la clonación de la secuencia de PreM/M-E salvaje en el vector p43.2. Después de la transformación con la conexión p43.2 + PreM/M-E salvaje, se inocularon 3 clones bacterianos en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las minipreparaciones obtenidas después se digirieron con las enzimas XhoI y NotI para confirmar la clonación de PreM/M-E salvaje en el vector p43.2 (p/YFE). Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 2000 y 5000 pares de bases. Todos los clones liberaron fragmentos del tamaño esperado (2000 pb, asteriscos).
- Figura 8: Digestión de ADN de plásmido para confirmar la clonación de la secuencia de p43.2-PreM/ME para la fusión con LAMP en el vector p43.2. Después de la transformación con la conexión p43.2 + PreM/M-E para la fusión con LAMP, se inocularon 8 clones bacterianos en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las minipreparaciones obtenidas después se digirieron con las enzimas NheI y XhoI para confirmar la clonación de p43.2-PreM/M-E para la fusión con LAMP en el vector p43.2. Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 2000 y 5000

pares de bases. Del total de 8 clones, 7 liberaron fragmentos del tamaño esperado (1900 pb, asteriscos).

Figura 9: Digestión de ADN de plásmido para confirmar la clonación de C-LAMP en el vector p43.2-PreM/ME para la fusión con LAMP. Después de la transformación con la conexión p43.2-PreM/ME + C-LAMP, se inocularon 7 clones bacterianos en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las minipreparaciones obtenidas después se digirieron con las enzimas XhoI y XbaI para confirmar la clonación de C-LAMP en el vector p43.2-PreM/ME/LAMP (pL/YFE). Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 100 y 7000 pares de bases. Del total de 7 clones, todos liberaron fragmentos del tamaño esperado (125 pb, asteriscos).

Figura 10: Células 293 transfectadas con las construcciones p/YFE a pL/YFE. La validación de la expresión de proteínas codificadas por los plásmidos p/YFE y pL/YFE, así como su localización intracelular, se realizó mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Se detectaron la proteína E y E/LAMP empleando un anticuerpo policlonal anti-YFV. Se confirmó la distribución esperada de la proteína E vírica salvaje, generalmente asociada con la membrana reticular (A). Además, la proteína quimérica E/LAMP (presente en células 293 transfectadas con pL/YFE) apareció distribuida por la membrana reticular, más concretamente asociada con las membranas lisosómicas (lo cual también se esperaba, debido a la presencia de LAMP).

Figura 11: Digestión de ADN de plásmido, en condiciones sin endotoxinas, para confirmar la identidad de los vectores (p/YFE y pL/YFE). Después de la transformación con las construcciones p/YFE y pL/YFE, se inocularon colonias aisladas de cada construcción en medio líquido para la posterior extracción del ADN de plásmido. Las gigapreparaciones obtenidas después se digirieron. La construcción con la forma salvaje (w/YFE) se sometió a dos ensayos de digestión. El primero se realizó con las enzimas XhoI y XbaI, en el que se produjo la linearización de la construcción (1), y también con las enzimas XhoI y NotI que generaron la liberación del fragmento codificado por p/YFE. La construcción con LAMP (pL/YFE) también se sometió a dos ensayos de digestión. El primero se realizó con las enzimas XhoI y XbaI, en el que se produjo la liberación de LAMP (asterisco), y también con las enzimas NheI y XbaI que generaron la liberación del fragmento codificado por pL/YFE. Los productos de la digestión después migraron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador de luz ultravioleta. Se empleó 1kb Plus Ladder (Invitrogen®) como marcador de peso molecular (PM), indicado como referencia en las bandas de 1650 y 100 pares de bases.

Figura 12: Comparación de las respuestas celulares inducidas en ratones Balb/C, empleando la vacuna 17DD y las construcciones p/YFE y pL/YFE. Se inmunizaron ratones Balb/C en los días 0 y 21 con: (A) 104 unidades formadoras de colonias (PFU) de la vacuna 17DD, (B) 50 ug de la vacuna pL/YFE, o (C) 50 ug de la vacuna p/YFE. De 7 a 10 días después de la última inmunización, se aislaron muestras de esplenocitos de los ratones para ensayar con ELISPOT-IFN- γ , empleando un banco de péptidos sintéticos, de 15 aminoácidos cada uno y con un "solapamiento" de 11 aminoácidos entre ellos, que cubren la proteína E completa de YFV. Esta figura representa un promedio de 2-4 experimentos realizados con "agrupaciones" de 3-5 ratones cada una.

Figura 13: Niveles de anticuerpos neutralizantes detectados en ratones BALB/c y C57B1/6 después de la inmunización con las vacunas 17DD, pL/YFE y p/YFE. Se inmunizaron ratones de ambas razas con vacunas convencionales o de ADN en los días 0, 30 y 45 y se obtuvo su suero inmunológico en los días 15, 45 y 60. Los sueros se ensayaron individualmente con neutralización de reducción de placas (PRNT), y se compararon con suero de mono que contenía anticuerpos neutralizantes contra YFV en una concentración conocida. La construcción pL/YFE, aunque induce una producción de anticuerpos neutralizantes aproximadamente 3,5 veces menor que la vacuna 17DD, es capaz de inducir unas titulaciones de anticuerpos neutralizantes al menos 7 veces mayores que las titulaciones inducidas por p/YFE.

Figura 14: Evaluación de la protección contra YFV, a través de una inyección intracerebral ensayada en ratones previamente inmunizados con 17DD y pL/YFE. Los ensayos de protección se realizaron empleando el modelo de inmunización/exposición, mediante la inyección de 10^5 PFU del virus de la vacuna 17DD (por vía intracerebral) en ratones previamente inmunizados con la vacuna 17DD y con la vacuna pL/YFE. Los animales se inmunizaron 3 veces (días 0, 30 y 45) y se expusieron 15 días después de la última inmunización. Tanto la vacuna 17DD como la vacuna pL/YFE fueron capaces de proteger al 100% de los animales expuestos. La tabla 2 añade la información de esta figura con relación al número de animales expuestos, así como la comparación de la eficacia de las vacunas de ADN en ambas razas.

Tabla 1: Oligonucleótidos (cebadores) empleados para generar las construcciones de vacuna p/YFE y pL/YFE. Para el diseño de los nucleótidos capaces de amplificar las secuencias de PreM/M-E salvaje y PreM/M-E-LAMP se empleó el software de dominio público Ape [desarrollado por Dr. M. Wayne Davis (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)].

Tabla 2: Resultados del ensayo de protección en ratones BALB/c y C57B1/6 que compara la vacuna 17DD con la vacuna de ADN pL/YFE. Los ratones inmunizados con la vacuna 17DD y con la construcción de ADN pL/YFE se expusieron por vía intracerebral a YFV 17DD. Ambas razas de ratones resultaron 100% protegidos por la vacuna convencional y por la vacuna de ADN. Como control negativo, los ratones se sometieron a los mismos programas de

inmunización con el vector p43.2 vacío y PBS.

5 Tabla 3: Comparación de los niveles de expresión de las proteínas de la envuelta del virus de la fiebre amarilla, salvajes y optimizadas, mediante citometría de flujo. Se transfectaron células 293 con 1 ug de cada vacuna de ADN empleando lipofectamina, y se tiñeron con suero de conejo anti-envuelta del virus de la fiebre amarilla. La transfección de las células se normalizó empleando como control interno un plásmido que codifica una proteína fluorescente y con relación al nivel de expresión de la proteína codificada por la construcción codificadora de la secuencia nativa de la envuelta (número 2). El plásmido optimizado (número 6) mostró un nivel de expresión 6,5 veces mayor que el plásmido que codifica la secuencia nativa (número 2).

Descripción detallada de la invención

10 Los presentes inventores han desarrollado y evaluado la eficacia de expresión y la capacidad para inducir una respuesta inmunológica de dos vacunas genéticas, ambas basadas en la estrategia de la coexpresión de las proteínas PreM/M y E de YFV (una salvaje y la otra fusionada con LAMP). Se emplearon ambas construcciones, (p/YFE) salvaje y con LAMP (pL/YFE), para transfectar células humanas, y se detectaron las respectivas proteínas codificadas por las construcciones mediante inmunofluorescencia. Después los vectores p/YFE y pL/YFE se
15 inocularon en ratones y se analizaron las respuestas inmunológicas inducidas por cada construcción, en términos de respuestas celulares y humorales. Los resultados se consideraron excelentes, puesto que las dos construcciones son capaces de inducir respuestas de células T contra los mismos epitopos inducidos por la vacuna 17DD, y PL/YFE también fue capaz de inducir unas titulaciones elevadas de anticuerpos neutralizantes. Estos vectores también se
20 inocularon en ratones que después fueron expuestos a YFV para evaluar si estas construcciones son capaces de proteger a estos animales contra FA. A pesar de que la construcción pL/YFE es capaz de generar unas titulaciones de anticuerpos neutralizantes más altas que la construcción salvaje p/YFE en Balb/c y en C57B1/6 inmunizados, ambas construcciones confieren 100% de protección a los ratones expuestos. Estos resultados se consideran excelentes.

25 La vacuna pL/YFE también se optimizó, generando la construcción pL/YFEopt, empleando el algoritmo genético del programa LETO 1.0 (Entelechon®). Se tomaron en cuenta varios factores en el proceso de optimización, tales como: utilización de codones, estructura secundaria del ARNm, presencia de motivos de ADN repetitivos, contenido en GC, presencia/ausencia de sitios de restricción, sitios de "corte y empalme" crípticos, etc. Las secuencias optimizadas se introdujeron en una síntesis comercial (Geneart®) y después se subclonaron en el vector 8L, salvaje y con LAMP. Las construcciones de vacuna optimizadas, así como p/YFE salvaje y pL/YFE, se inocularon en ratones
30 convencionales y transgénicos (que expresan HLA humanas) y se evaluaron para su inmunogenicidad empleando ensayos ELISPOT, neutralización de virus mediante reducción de placas (PRNT) y desafío frente a YFV.

La invención se describirá a continuación empleando ejemplos. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y representan realizaciones preferidas; los expertos en la técnica saben o pueden saber, empleando solo la experimentación habitual, cómo emplear otros materiales y técnicas apropiadas.

35 *Amplificación con PCR*

Los cebadores diseñados (tabla 1) para la amplificación de PreM/M-E salvaje, PreM/M-E para la fusión con LAMP y el dominio C-terminal de LAMP, permiten obtener las respectivas secuencias con los pesos moleculares esperados. La secuencia de PreM/M-E salvaje se amplificó empleando cebadores que flanquean la región N-terminal de PreM/M (de modo más específico, el nivel de la región carboxi-terminal de la cápsida) y la región transmembrana C-terminal de la envuelta. Para la amplificación de la secuencia de PreM/M-E, con el objetivo de la fusión con el dominio C-terminal de LAMP, el cebador "directo" empleado se diseñó para alinearse con la misma región de la cápsida. Además, el cebador "inverso" utilizado se diseñó para alinearse más internamente dentro de la región que codifica la envuelta. Así, la secuencia de PreM/M-E (para la fusión con LAMP) carece del dominio transmembrana C-terminal de la envuelta, con el objetivo de su sustitución por el dominio C-terminal de LAMP (figura 1).

45 El producto de la PCR de PreM/M-E para la fusión con LAMP tiene aproximadamente el mismo tamaño que el producto de PreM/M-E salvaje, puesto que la región eliminada de la envuelta solo tiene 100 pares de bases (pb). Para sustituir este dominio transmembrana C-terminal de la envuelta, se diseñaron cebadores capaces de amplificar la región C-terminal de LAMP-1 humana (C-LAMP). El cebador "directo" permite fusionar (en fase) PreM/M-E con C-LAMP, mientras que el cebador "inverso" presenta el codón de fin de la traducción. El producto de la PCR de la
50 secuencia de PreM/M-E salvaje, con aproximadamente 2000 pares de bases (pb), puede observarse en la figura 2. Los productos de la PCR de PreM/ME para la fusión con LAMP (1900 pb) y C-LAMP (125 pb) pueden observarse en la figura 3.

Clonación de los productos de la PCR obtenidos en el vector pGEMT-Easy

Tras confirmar los tamaños esperados de los productos de la PCR de PreM/ME salvaje, PreM/M-E para la fusión con LAMP y C-LAMP, estos fueron clonados en el vector pGEMT-Easy. Para facilitar la selección de los clones positivos, se seleccionaron los clones que contenían la inserción insertada en el fragmento lacZ del gen de la β - galactosidasa, pero solo los clones blancos de cada construcción. Se seleccionaron 3 clones de la placa que contenía las bacterias transformadas con la conexión pGEMT-Easy + PreM/ME salvaje. Estos clones se inocularon

en medio de crecimiento líquido para la posterior preparación de ADN de plásmido (minipreparaciones) y la prueba de digestión para confirmar la clonación. De los 3 clones seleccionados, solo 1 libera la inserción esperada de 2000 pb de la construcción de PreM/M-E salvaje (figura 4). Con respecto a la conexión pGEMT-Easy + PreM/ME para la fusión con LAMP, se seleccionaron 8 clones blancos. Estos clones también se sometieron a una extracción del plásmido y a las pruebas de digestión. De los 8 clones seleccionados, 3 liberaron la inserción de 1900 esperada, con relación a la construcción PreM/M-E para la fusión con LAMP (figura 5). Se seleccionaron 3 clones de la conexión pGEMT-Easy + C-LAMP, todos los cuales liberaron la inserción después de la digestión (figura 6).

Subclonación de los fragmentos clonados en pGEMT-Easy en el vector p43.2

Para la subclonación de PreM/M-E en el vector p43.2, este fragmento se cortó del vector pGEMT-Easy y se insertó en el vector p43.2. Para facilitar la selección de los clones positivos, se conectaron 3 concentraciones diferentes de inserción a una concentración constante de vector p43.2 (se realizó una conexión en ausencia de inserción como control negativo). Así, se seleccionó la placa con el mayor número de clones, mediante la comparación de las placas con diferentes concentraciones de inserción con el control negativo para la selección de clones. Se seleccionaron 3 clones de esta placa que contenían bacterias transformadas con la conexión p43.2 + PreM/M-E salvaje. Estos clones se inocularon en medio de crecimiento líquido para la posterior preparación de ADN de plásmido y la prueba de digestión para confirmar la clonación. De los 3 clones seleccionados, todos liberaron la inserción de 2000 pb esperada de la construcción de p/YFE (figura 7). Con respecto a la construcción p43.2 + PreM M-E/LAMP, fue necesario construir un vector intermedio que contenía PreM/M-E para la fusión con LAMP, para la posterior fusión de LAMP. Así, el fragmento PreM/M-E para la fusión con LAMP se cortó del vector pGEMT-Easy y se subclonó en el vector p43.2, generando la construcción intermedia p43.2-PreM/M-E para la fusión con LAMP. Se seleccionaron 8 clones de esta conexión, de los cuales 7 liberaron la inserción de 1900 pb esperada después de la prueba de la digestión (figura 8). Para fusionar LAMP al fragmento p43.2-PreM/ME para la fusión con LAMP, C-LAMP fue cortado y escindido del vector pGEMT-Easy/C-LAMP y después fue purificado. Después, el vector p43.2-pM/ME para la fusión con LAMP se cortó con las mismas enzimas, lo cual permite la inserción de LAMP en su C-terminal, generando la construcción pL/YFE. Para confirmar la inserción de LAMP en p43.2-PreM/ME para la fusión con LAMP, se digirieron 7 clones, y todos liberaron el fragmento de 125 pb esperado (figura 9).

Secuenciación de las construcciones p/YFE y pL/YFE

Para confirmar la identidad y la calidad de las secuencias subclonadas en el vector p43.2, los respectivos vectores se secuenciaron empleando cebadores internos diseñados para hibridarse a cada 400 pb de las inserciones clonadas (que significa "directo" e "inverso"). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante los programas ApE® y Lasergene®. En la construcción p/YFE se encontraron dos mutaciones puntuales no silenciosas, es decir, con este cambio, el total de aminoácidos es de 644. Los cambios fueron de una alanina (A) a una valina (V) en la posición 250, y de una serina (S) a un ácido aspártico (D) en la posición 349. Estas mutaciones también fueron las únicas encontradas en la construcción pL/YFE, lo cual indica que las mutaciones no aparecen al nivel de la PCR sino que ya estaban presentes en el molde de ADN empleado para la amplificación. Teniendo en cuenta que la proteína E presenta varios epitopos para células B (porque solo las proteínas E y NS1 son capaces de generar anticuerpos neutralizantes), así como para células T (los datos no se muestran, fueron obtenidos por empleados del grupo de los inventores), se considera que estas mutaciones son irrelevantes para este estudio de desarrollo de vacunas.

Detección de las proteínas E y E/LAMP mediante inmunofluorescencia

Para evaluar la expresión de las proteínas E y E/LAMP codificadas por las construcciones p/YFE y pL/YFE, respectivamente, se transfectaron células 293 humanas con estas vacunas de ADN. A pesar de la baja eficacia de expresión (aproximadamente 40%), ambas proteínas fueron detectadas en el compartimento celular apropiado. Tal como se esperaba, se confirmó la distribución reticular característica del antígeno salvaje E (figura 10A), así como la distribución lisosómica característica de la proteína E-LAMP (figura 10B).

Evaluación de la respuesta inmunológica inducida en ratones inmunizados con las vacunas p/YFE y pL/YFE

Para los ensayos de inmunización, las vacunas de ADN p/YFE y pL/YFE se prepararon inicialmente a gran escala sin endotoxinas. Las preparaciones obtenidas se sometieron a pruebas de digestión con enzimas específicas para asegurar la calidad/identidad de los vectores. El vector p/YFE se digirió con las enzimas XhoI y XbaI y las enzimas XhoI y NotI, mientras que el vector pL/YFE se digirió con las enzimas XhoI y XbaI y las enzimas NheI y XbaI. Todas las digestiones liberaron fragmentos de ADN con el tamaño esperado (figura 11). Después, las construcciones p/YFE y pL/YFE se emplearon para ensayos experimentales de inmunización en ratones.

Los plásmidos p/YFE y pL/YFE, sin endotoxinas, se inocularon en ratones BALB/c y C57B1/6, y se empleó como control positivo la vacuna 17DD y como controles negativos disolución salina y el vector p43.2 vacío. Las respuestas inmunológicas inducidas por cada construcción se analizaron en términos de respuesta celular (mediante el ensayo "Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT" (ELISPOT), SPOT inmunoabsorbente ligado a enzimas) y respuesta humoral (mediante ensayos de neutralización de virus, PRNT). Los resultados obtenidos se consideraron excelentes, porque las dos construcciones son capaces de inducir una respuesta de células T contra los mismos epitopos inducidos por la vacuna de virus atenuados convencional (figura 12), y la construcción pL/YFE aún fue

capaz de inducir anticuerpos neutralizantes a una concentración considerada bastante satisfactoria. La construcción pL/YFE, aunque induce una producción de anticuerpos neutralizantes aproximadamente 3,5 veces menor que la vacuna 17DD, es capaz de inducir unas titulaciones de anticuerpos neutralizantes al menos siete veces mayores que p/YFE (figura 13).

- 5 El vector pL/YFE después se inoculó 3 veces (50 µg/inmunización) en ratones BALB/c y C57BL/6. De nuevo, se empleó la vacuna 17DD como control positivo, y se emplearon el vector p43.2 vacío y disolución salina (1X PBS) como controles negativos. Dos semanas después de la última inmunización, los animales se expusieron a una inoculación contra YFV por medio del inóculo de 10⁵ unidades formadoras de placa (PFU) de la vacuna 17DD (por vía intracerebral). La vacuna 17DD y la vacuna de ADN pL/YFE (E-LAMP) confirieron una protección del 100% a los ratones expuestos (figura 14 y tabla 2).

Optimización de la vacuna pL/YFE que genera las construcciones pL/YFEopt1 y pL/YFEopt2

- 15 Para mejorar la eficacia de la expresión del antígeno E en células eucariotas, con el objetivo de experimentar en primates, se optimizó la secuencia de ADN que codifica la proteína E. Esta secuencia se analizó/optimizó con respecto a características tales como la "utilización de codones", estructura secundaria del ARN mensajero (ARNm), distribución del contenido en GC, motivos de ADN repetitivos, sitios de restricción, sitios de "corte y empalme" crípticos, etc. El proceso de optimización toma en cuenta los diversos parámetros mencionados anteriormente, y busca un equilibrio entre todos.

- 20 Se generaron dos versiones optimizadas de la vacuna pL/YFE, denominadas pL/YFEopt1 y pL/YFEopt2. Las construcciones optimizadas después se emplearon para transfectar células 293 humanas, con el objetivo de evaluar la eficacia de expresión del antígeno E-LAMP optimizado (E-LAMP_{OPT1-2}) con respecto al antígeno E-LAMP salvaje. Mediante un ensayo de inmunofluorescencia, se consideró que la expresión de E-LAMP es al menos 20 veces mayor (los datos no se muestran). Aunque no se han realizado ensayos cuantitativos de transferencia Western para evaluar con más precisión el número de veces que E-LAMPOPT1 se expresa más con relación a E-LAMP salvaje, se puede decir que la expresión de estos antígenos de E-LAMPOPT1 es significativamente mayor que la expresión del antígeno salvaje.

- 25 Considerando la mayor eficacia de la expresión de p43.2/E-LAMP_{OPT1-2} con relación a p43.2/E-LAMP salvaje, se cree que probablemente la vacuna de ADN optimizada será aún más eficaz que la vacuna salvaje previamente ensayada. Es posible que la mayor eficacia de expresión venga acompañada de una mayor titulación de anticuerpos neutralizantes, aumentando así el potencial de la vacuna optimizada con respecto al número de dosis y concentración de ADN en cada dosis. Aunque el vector p43.2 ha sido optimizado para la expresión en células eucariotas (mediante la combinación de promotores específicos, factores de transcripción, secuencias señal para la poliadenilación, marcadores de resistencia, etc.), algunas secuencias de ADN contenidas en este (tal como, por ejemplo, la secuencia que codifica el marcador de resistencia a la ampicilina) no están permitidas por the Food and Drug Administration (FDA) para su uso en seres humanos. Por otra parte, otros vectores de expresión, tales como el vector 8L, por ejemplo, no presentan estas secuencias no deseadas y, por tanto, no están prohibidos por la FDA. Así, los antígenos E-LAMP_{OPT1-2} pudieron clonarse en el vector 8L y generaron las construcciones p8L/E-LAMP_{OPT1-2} que inicialmente se evaluarán en ratones y después en monos.

Ejemplo 1: Construcción de los vectores de transfección p43.2-PreM/M-E (p/YFE) y p43.2-PreM/M-E-LAMP (pL/YFE)

- 40 1.1 - Amplificación y purificación de los productos de la PCR

- La secuencia de PreM/M-E de VFA, que incluye la secuencia carboxi-terminal de la cápsida (responsable de la translocación de PreM/M al retículo endoplásmico) se amplificó mediante PCR, a partir de un plásmido que contenía el genoma completo de VFA [el clon infeccioso fue suministrado amablemente por Dr. Ricardo Galler (Biomanguinhos-IOC/FIOCRUZ)]. El PreM/M- E fue amplificado con dos parejas distintas de cebadores para obtener la secuencia salvaje (que se extiende desde el nucleótido 392 hasta el nucleótido 2452 del genoma del virus de la fiebre amarilla, basándose en la secuencia con n.º de registro NC 002031 de Genbank - NCBI), así como a partir de una secuencia de fusión que incorpora LAMP en la región carboxi-terminal (que se extiende desde el nucleótido 392 al nucleótido 2323 del genoma del virus de la fiebre amarilla, basándose en la secuencia con n.º de registro NC 002031 de Genbank - NCBI). La secuencia C-terminal de LAMP se amplificó a partir de un plásmido que contenía las regiones N-terminal y C-terminal de LAMP-1 humana, p43.2 hLAMP/GAG [suministrado amablemente por Dr. Ernesto Marques (LaViTE- CPqAM/FIOCRUZ)]. Se emplearon cebadores específicos que permiten la incorporación de sitios de restricción específicos, del codón ATG de inicio de la traducción (en contexto con la secuencia Kozak) y del codón de fin de la traducción (véase la tabla 1). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía: 1X tampón Tgo (Roche®); dNTP 0,2 mM (Invitrogen®); 0,6 µM de cada cebador; 1 unidad de la enzima ADN polimerasa Tgo (Roche®); 10 ng del ADN molde. Las muestras se amplificaron en un termociclador de gradiente Mastercycler (Eppendorf®) programado como sigue: 1- 94 °C durante 2 min (desnaturalización); 2 - [94 °C durante 1 minuto (desnaturalización); 55 °C durante 30 segundos (hibridación); 68 °C durante 75 segundos (extensión) - 30 ciclos (amplificación)]; 3 - 68 °C durante 10 minutos (extensión y relleno de los fragmentos incompletos). Los productos de la PCR migraron en un gel de agarosa para la posterior purificación empleando el kit

comercial QIAEX II (Qiagen®), según las recomendaciones del fabricante.

1.2 - Clonación de los productos de la PCR en un vector de replicación

Los productos de la PCR purificados después se sometieron a un tratamiento con la enzima ADN polimerasa Taq (Invitrogen®) para añadir adeninas libres a sus extremos. Esta reacción se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía: 1X de tampón de polimerasa Taq (Invitrogen®); MgCl₂ 1,5 mM; dATP 2 mM (Invitrogen®); 5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen®); 5 µl del producto de la PCR purificado. Las muestras se incubaron a 72 °C durante 20 minutos en un termociclador de gradiente Mastercycler (Eppendorf®). Después del tratamiento con la ADN polimerasa Taq (Invitrogen®), los productos de la PCR adenilados se emplearon para la clonación en el vector pGEMT-Easy (Promega®). Las reacciones de conexión se realizaron empleando el kit I del sistema del vector pGEMT-Easy (Promega®) en un volumen final de 10 µl que contenía: 1X tampón "Rapid Ligation"; 50 ng del vector pGEMT-Easy; 0,4 unidades de ADN ligasa T4; 2 µl de los productos de la PCR tratados. La reacción de conexión se realizó a 4 °C durante aproximadamente 15 horas. Después las conexiones se emplearon para transformar células competentes para confirmar la clonación. Las transformaciones se realizaron en un volumen final de 80 µl que contenía: 50 µl de células competentes (*Escherichia coli* TG1); 25 µl de tampón de transformación (MgCl₂ 5 mM; Tris-HCl 5 mM, pH 7,4); 5 µl de cada producto de la conexión. Las reacciones de transformación se incubaron durante 30 minutos sobre hielo y después se sometieron a un choque térmico (37 °C - 5 minutos) y se volvieron a enfriar en hielo. Las células se sembraron en placas con medio de cultivo sólido Luria-Bertani (LB), que contenía ampicilina en una concentración de 50 µg/ml e IPTG/X-Gal (IPTG 10 mM; 0,1 mg de X-Gal). Las placas se incubaron durante aproximadamente 15 horas a 37 °C, y después se incubaron a 4 °C durante 1 hora para facilitar la discriminación entre los clones vacíos (azul) y los clones que contenían la inserción (blancos).

1.3 - Preparación del ADN del plásmido

Para confirmar la clonación se seleccionaron las colonias blancas de cada conexión para preparar el ADN del plásmido y la prueba de digestión. Las colonias se inocularon en 2 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina (50 µg/ml), y se cultivaron durante aproximadamente 15 horas a 37 °C. Después se centrifugaron 1,5 ml de cada cultivo (13.200 rpm - 5 minutos) para obtener un sedimento bacteriano. La extracción del ADN del plásmido se realizó a partir de estos "sedimentos" empleando el kit de minipreparaciones de centrifugación QIAprep (Qiagen®), según las recomendaciones del fabricante. Después se emplearon los ADN del plásmido, 50 µl cada uno, para la confirmación de la clonación mediante ensayos de digestión. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 10 µl que contenía: 1X tampón de digestión; 1,5 µl de ADN del plásmido. Todas las digestiones se realizaron a 37 °C durante aproximadamente 4 horas. El vector pGEMT-Easy que contenía el fragmento PreM/M-E se digirió con 0,01 unidades de la enzima XhoI y 0,01 unidades de la enzima NotI. El vector pGEMT-Easy, que contenía la misma secuencia pero con sitios de restricción diferentes que permiten la inserción posterior de LAMP, se digirió con 0,005 unidades de la enzima NheI y 0,01 unidades de la enzima XhoI. Así, el vector pGEMT-Easy que contiene el fragmento C-LAMP fue digerido con 0,01 unidades de la enzima XhoI y 0,01 unidades de la enzima XbaI. A partir de los resultados de la digestión, verificados sobre gel de agarosa, se digirieron los clones positivos de cada construcción a mayor escala para la posterior purificación de los fragmentos. Las reacciones de digestión a gran escala se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía: 1X tampón de digestión; 15 µl de ADN del plásmido. Todas las digestiones se realizaron a 37 °C durante aproximadamente 4 horas. El vector pGEMT-Easy que contiene el fragmento PreM/M-E se digirió con 0,1 unidades de la enzima XhoI y 0,05 unidades de la enzima NotI. El vector pGEMT-Easy que contiene el fragmento PreM/M-E para la fusión con LAMP se digirió con 0,05 unidades de la enzima NheI y 0,1 unidades de la enzima XhoI, y el vector pGEMT-Easy que contiene el fragmento C-LAMP se digirió con 0,1 unidades de la enzima XhoI y 0,1 unidades de la enzima XbaI. Después, cada fragmento se purificó mediante extracción en un gel de agarosa, empleando el kit de extracción en gel QIAEX kit II (Qiagen®).

1.4 - Subclonación de PreM/M-E salvaje y PreM/M-E-LAMP en el vector p43.2

El vector p43.2 se sometió a reacciones de digestión para crear sitios de restricción compatibles con los sitios de los fragmentos de PreM/M-E salvaje y PreM/M-E para la fusión con LAMP. Las reacciones de digestión se realizaron en dos etapas, primero con una enzima y después con otra. Para la clonación de PreM/M-E salvaje (p/YFE), la primera reacción de digestión se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 1X tampón de digestión; 15 µl de la muestra del vector, y 0,05 U de la enzima NotI (Biolabs®). La digestión se realizó a 37 °C durante aproximadamente 4 horas. Después de la digestión se verificó si se había producido la linearización del vector comparando el tamaño entre la muestra digerida y el vector intacto, migrando ambos bajo las mismas condiciones en un gel de agarosa. Tras haber verificado la linearización, la muestra se precipitó con etanol y se resuspendió en un volumen final de 40 µl. La segunda reacción de digestión se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 1X tampón de digestión; 40 µl de la muestra del vector, y 0,1 unidades de la enzima XhoI. Al igual que la clonación de PreM/ME para la fusión con LAMP, el vector p43.2 se sometió a una esquema de digestión muy similar al empleado para la clonación del fragmento salvaje, y empleando las enzimas NheI y XhoI. Las digestiones se realizaron a 37 °C durante aproximadamente 6 horas. Las reacciones de conexión de ambos fragmentos al vector p43.2 se realizaron en un volumen final de 10 µl que contenía: 1X tampón de ADN ligasa T4 (New England Biolabs®); 100 ng del vector p43.2 (roto con XhoI/NotI o NheI/XhoI); 0,4 unidades de ADN ligasa T4 (New England Biolabs®); 3 µl de cada fragmento purificado. Las reacciones de conexión se realizaron a 16 °C durante aproximadamente 20 horas. Después las

conexiones se emplearon para transformar células competentes para confirmar la clonación. Los procedimientos de transformación, preparación y digestión del ADN del plásmido fueron los mismos que los descritos anteriormente. Por último, para la inserción del fragmento C-terminal de LAMP (C-LAMP) en el vector p43.2-PreM/M-E para la fusión con LAMP, tanto el vector como el fragmento C-LAMP fueron digeridos con las enzimas XhoI y XbaI (para obtener la construcción pL/YFE).

1.5 - Secuenciación del ADN

Las construcciones p/YFE y pL/YFE se sometieron a una secuenciación automática para la certificación de la identidad/calidad de las secuencias clonadas. La reacción de secuenciación se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía: 1X tampón "Save money" (Tris-HCl 200 mM/pH 9,0, MgCl₂ 5 mM); 0,32 µM de cada cebador (un total de seis cebadores internos); 0,5 µl de disolución "Bigdye" (Applied Biosystems®); 200 ng de ADN. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems®) para la desnaturalización. Después estas muestras se sometieron a los siguientes ciclos de PCR para la secuenciación: 1- 94 °C durante 2 min (desnaturalización inicial); 2 - [94 °C durante 15 segundos (desnaturalización); 50 °C durante 10 segundos (hibridación); 60 °C durante 4 minutos (extensión) - 45 ciclos]. Las muestras se precipitaron en isopropanol al 65%, se lavaron con etanol al 60% y se resuspendieron en 15 µl de formamida (Applied Biosystems®). Las muestras se secuenciaron en Integrated Core Technology (NIT) del CPqAM, empleando el secuenciador automático de ADN ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) según las convenciones previamente establecidas de esta unidad.

Ejemplo 2: Cultivo, infección y transfección de células eucariotas

Se cultivaron células 293 eucariotas en medio DMEM (Invitrogen®) suplementado con: suero bovino fetal al 10% (Gibco®); penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco®); L-glutamina al 1% (Sigma®). Estas células se emplearon para ambos ensayos de infección vírica y para los experimentos de transfección. Después de alcanzar una confluencia de aproximadamente 90%, las células se infectaron con un extracto vírico de YFV a la concentración de 0,36 x 10⁶ unidades formadoras de placa (PFU), suministrado amablemente por Dr. Marli Tenório (CPqAM/LaViTE). Para la infección, las células se incubaron inicialmente con el extracto de YFV puro (1 hora/37 °C/5% de CO₂) y después se añadió medio DMEM completo para el mantenimiento celular. Las células infectadas permanecieron en las mismas condiciones de incubación (37 °C/5% de CO₂) durante 48 horas, hasta que presentan los efectos citopatológicos provocados por los virus. Para los ensayos de transfección, las células 293 se cultivaron bajo las mismas condiciones anteriores. Después fueron incubadas con 0,8 µg de cada ADN (p/YFE y pL/YFE), empleando como control negativo el vector p43.2 vacío y como control positivo el gen indicador de la β-galactosidasa. Las reacciones de transfección se realizaron empleando el kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen®), según las recomendaciones del fabricante. Las células transfectadas se incubaron (48 horas/37 °C/5% de CO₂) y se procesaron para la evaluación de la eficacia de transfección mediante la actividad de la expresión del gen indicador. Para la reacción de coloración de β-gal, las células primero se lavaron en 1X PBS y se fijaron en disolución de glutaraldehído al 0,2%/PBS. Después las células fijadas se incubaron en un volumen final de 1 ml de una disolución que contenía: 20 mg de X-Gal; 0,005 M de ferriciamida de potasio; 0,005 M de ferriciamida de potasio; 0,002 M de MgCl₂ en 1X PBS, para revelar la coloración de la actividad β-gal.

Ejemplo 3: Transfección y análisis de la expresión mediante inmunofluorescencia

Se cultivaron células 293 en cubreobjetos y se transfectaron con las construcciones de vacuna obtenidas empleando el kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies®). Se empleó el vector p43.2 vacío como control negativo. Las transfecciones se realizaron en placas de cultivo de 24 pocillos con 2,5 µg de cada plásmido y 10 µl de lipofectamina, según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 48 horas y después se fijaron en metanol al 100% a -20 °C durante 5 minutos, se bloquearon en disolución de BSA al 1%/PBS durante 30 minutos, y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-virus de la fiebre amarilla (producido en ratones en el terrario de CPqAM) a una dilución de 1:200. Se empleó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488, producido en cabras, a una dilución de 1:500 (Molecular Probes, Seattle, EEUU). Después, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos empleando el "Prolong gold" normal (Molecular Probes, Seattle, EEUU) y se visualizaron mediante microscopía confocal. Las imágenes se obtuvieron mediante el microscopio confocal Leica SP11-AOBS (Leica Microsystems, Hm®) utilizando el objetivo de lente 63 x NA 3.1 sumergido en aceite de inmersión. El fluorocromo Alexa 488 se excita empleando el láser Arkr a una longitud de onda de 488 nm y las imágenes digitales se capturaron empleando el software Leica, en el formato RGB de 24 bits, en un área de 1024 x 1024 píxeles. Los campos de captura se seleccionaron según la dispersión y morfología de las células.

Ejemplo 4: Evaluación de la respuesta inmunológica inducida en ratones inmunizados con las vacunas p/YFE y pL/YFE

4.1 - Adquisición de vectores de vacuna a gran escala

Las construcciones que codifican las proteínas E víricas de tipo salvaje (p/YFE) y la proteína E fusionada con la proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP) (pL/YFE) se sometieron a la preparación de ADN de plásmido a mayor escala. Se emplearon partes alícuotas de cada ADN para transformar células competentes (*E. coli* TG1).

5 Después se eligió una única colonia de cada placa para ser inoculada en 12 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina (50 µg/ml), y se cultivaron durante aproximadamente 8 horas a 37 °C bajo agitación vigorosa. Después de esto, cada cultivo se inoculó en 2,5 litros de medio LB/ampicilina y se cultivó a 37 °C durante 16 horas bajo agitación vigorosa. Después el cultivo se centrifugó (8.000 RPM - 15 minutos) para obtener el sedimento bacteriano. A partir de este "sedimento" se realizó la extracción del ADN del plásmido (condiciones sin endotoxinas) empleando el kit comercial Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen®), según las recomendaciones del fabricante. Los ADN de plásmido se sometieron a ensayos de digestión en un volumen final de 10 µl que contenía: 1X tampón de digestión, 1 µl de cada ADN de plásmido y enzima de restricción específica. Las digestiones se realizaron a 37 °C durante aproximadamente 4 horas.

10 4.2 - Animales y protocolos de inmunización

15 Para los ensayos de neutralización y protección se inmunizaron ratones BALB/c y C57B1/6 hembra de 3 semanas de edad en los días 0, 30 y 45. Un día antes de cada inmunización se recolectaron muestras de suero de cada animal. Los ratones se inmunizaron en la base de la cola con la vacuna de virus atenuados 17DD a 10⁴ PFU/50 µl (control positivo), vacunas de ADN p/YFE y pL/YFE (ambas a una concentración de 50 µg/50 µl), así como con el vector vacío y PBS (controles negativos). Todos los procedimientos se realizaron según los requisitos de the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), según el protocolo P-0259-05 aprobado por este comité.

4.3 - Ensayos de neutralización de placas

20 Para el análisis de las titulaciones de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunaciones con 17DD y con las construcciones p/YFE y pL/YFE, se realizaron ensayos para la neutralización de virus mediante reducción de placas (PRNT). Estos ensayos se realizaron empleando muestras de suero de ratones Balb/c y C57BL/6 recogidas antes y después de la vacunación. Los ensayos de neutralización se evaluaron mediante la reducción de la formación de placas del virus de la fiebre amarilla cultivados en células Vero. Después de la inactivación del suero (30 min/56 °C), se incubaron diluciones en serie con 50-100 PFU de virus durante 30 min a 37 °C, y se añadieron a placas de 6 pocillos que contenían células Vero. Después de una hora de incubación se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido que contenía agarosa. Después de 8 días de incubación, las placas se fijaron y se detectó la formación de placas víricas mediante un ensayo inmunológico de peroxidasa. El ensayo de neutralización por reducción de placas se define mediante la dilución a la cual el número de placas se reduce en 50%, PRNT50, cuando se compara con el control.

4.4 - Ensayos de evaluación de la seguridad

30 En los ensayos de protección se emplearon ratones Balb/c y C57BL/6 inmunizados 3 veces con la vacuna 17DD o las vacunas de ADN. Los animales se expusieron por medio de un inóculo intracerebral que contenía 10.000 PFU de virus 17DD, 15 días después de la última inmunización. Los animales se controlaron durante 21 días para evaluar los síntomas de neurovirulencia y mortalidad. Los animales moribundos se sacrificaron mediante exposición a CO₂.

Ejemplo 5: Optimización del vector pL/YFE a través del algoritmo genético

35 Para mejorar la eficacia de la expresión del antígeno codificado por la vacuna pL/YFE en células eucariotas, con el objetivo de futuros experimentos en modelos de primates, se optimizó la secuencia de ADN que codifica la proteína PreM/M-Env empleando el algoritmo genético. Esta secuencia se analizó/optimizó con respecto a características tales como la "utilización de codones", estructura secundaria del ARN mensajero (ARNm), distribución del contenido en GC, motivos de ADN repetitivos, sitios de restricción, sitios de "corte y empalme" críticos, etc. La secuencia optimizada se subclonó en el vector 8L, generando la construcción p8L/YFEopt.

40

Tabla 1 - Oligonucleótidos utilizados para generar las construcciones de vacuna p/YFE y pL/YFE

Secuencia diana	Cebadores utilizados (directo X inverso)
PreM/M-E salvaje	5' ACCGCTCGAGGGCCACCC ATGGG AGGATTGTCTCAAGGAAACG 3' (XhoI) (Met)
PreM/M-E para LAMP	5' ACCGGCTAGCGCCACCC ATGGG AGGATTGTCTCAAGGAAACG 3' (NotI) (Fin)
LAMP (C-terminal)	5' ACCGCTCGAGGGTTCAAGCCGCCAAATAGCCCC 3' (XhoI)
	5' ACCGCTCGAGACCGCTGATCCCCATCGGTGTGG 3' (XhoI)
	5' ACCGCTAGACTAGATAGTCTGGTAGCCTGCGTGACTCC 3' (XbaI) (Fin)

Tabla 2 - Resultados del ensayo de protección en ratones BALB/c y C57B1/6 que compara la vacuna 17DD con la vacuna de ADN pL/YFE

Inmunización/Exposición (10 ⁶ PFU/vacuna 17DD)	Mortalidad de BALB/c (Muertos/Inoculados)	Mortalidad de C57B1/6 (Muertos/Inoculados)
Vacuna 17DD	0/10	0/10
pL/YFE	0/10	0/10
p43.2/vacío o PBS	8/10	10/10

5 Tabla 3 - Comparación de los niveles de expresión de las proteínas de la envuelta del virus de la fiebre amarilla, salvajes y optimizadas, mediante citometría de flujo

Plásmido	Expresión normalizada por el salvaje 2. (%)
1. p43.2/vacío	0,03
2. p43.2/ENV/c-LAMP/salvaje	100
3. p43.2/ENV/c-LAMP/OPT-GA	450
4. p43.2/ENV/c-LAMP/OPT-LT	465
5. p8L/LAMP/vacío	0,00
6. p8L/ENV/c-LAMP/OPT-GA	625
7. p8L/ENV/c-LAMP/OPT-LT	350

10 La vacuna de virus atenuados 17DD es la única formulación disponible para proteger a los seres humanos frente a la infección provocada por el virus de la fiebre amarilla (YFV), la principal fuente de morbilidad y mortalidad en las áreas tropicales del mundo. A pesar del éxito de la vacunación en masa con la vacuna 17DD, que es capaz de inducir una respuesta duradera de anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T citotóxicas, en la bibliografía se han indicado sistemáticamente acontecimientos graves adversos como consecuencia de la vacunación contra la fiebre amarilla. En algunos casos, la vacunación se ha asociado directamente con un aumento en la gravedad de los síntomas e incluso puede conducir a reacciones mortales. En este escenario, el desarrollo de una nueva estrategia de vacunación, tal como las vacunas de ADN que codifican secuencias víricas específicas, reviste una importancia fundamental para el desarrollo de estrategias de vacunas aún más seguras.

20 La vacuna de ADN contra la fiebre amarilla, tal como se describe en la presente, se basa en la secuencia que codifica la proteína de la envuelta de YFV (p/YFE). Además de la construcción salvaje p/YFE, la secuencia de E también se fusionó con la secuencia que codifica la proteína de membrana asociada a lisosomas humana (h-LAMP) para generar una construcción (pL/YFE). La fusión con LAMP intenta dirigir el antígeno a la vía de presentación/degradación de antígenos MHCII, puesto que varios trabajos han demostrado que los antígenos fusionados con LAMP (antígeno/LAMP) son capaces de generar una mayor actividad proliferativa de linfocitos específicos de antígenos, unas mayores titulaciones de anticuerpos y una intensa actividad T citotóxica, con relación a los antígenos salvajes no fusionados con LAMP.

25 Esta invención se dirige a optimizar la vacuna de ADN contra YFV, p8L/YFEopt, para que sea capaz de proteger a los seres humanos frente a una infección provocada por YFV. El desarrollo de este tipo de tecnología se dirige a generar una vacuna aún más segura que la vacuna 17DD, que podría revolucionar la estrategia de vacunación contra el YFV en Brasil y en todo el mundo. Por último, las estrategias utilizadas para la construcción de esta vacuna de ADN también podrían servir de contribución al desarrollo de otras vacunas víricas, en especial contra otros flavivirus, tales como la encefalitis japonesa, la fiebre del Nilo occidental y el virus del dengue.

30

Listado de secuencias

- <110> Fundação Oswaldo Cruz
- <120> Vacuna de ADN contra el virus de la fiebre amarilla
- <130> P1756
- 5 <140> PCT/BR2010/000352
 - <141> 2010-10-26
 - <150> BR PI0905645-9
 - <151> 2009-10-27
 - <160> 12
- 10 <170> PatentIn version 3.5
 - <210> 1
 - <211> 42
 - <212> ADN
 - <213> Virus de la fiebre amarilla
- 15 <400> 1
 - accgctcgag gccacatgg gaggattgtc ctcaaggaaa cg 42
 - <210> 2
 - <211> 37
 - <212> ADN
- 20 <213> Virus de la fiebre amarilla
 - <400> 2
 - accggcggcc gtcagttca agccgcaaaa tagcccc 37
 - <210> 3
 - <211> 42
 - <212> ADN
- 25 <213> Virus de la fiebre amarilla
 - <400> 3
 - accggctagc gccacatgg gaggattgtc ctcaaggaaa cg 42
 - <210> 4
 - <211> 32
 - <212> ADN
- 30 <213> Virus de la fiebre amarilla
 - <400> 4
 - accgctcgag gttcaagccg ccaaatagcc cc 32
 - <210> 5
 - <211> 32
 - <212> ADN
- 35 <213> Virus de la fiebre amarilla
 - <400> 5
 - accgctcgag acgctgatcc ccatcgctgt gg 32
 - <210> 6
 - <211> 39
 - <212> ADN
- 40 <213> Virus de la fiebre amarilla
 - <400> 6
 - accgtctaga ctatagatgc tggtagcctg cgtgactcc 39
 - <210> 7
 - <211> 1953
 - <212> ADN
- 45 <213> Virus de la fiebre amarilla
 - <210> 7
 - <211> 1953
 - <212> ADN
- 50 <213> Virus de la fiebre amarilla

ES 2 605 654 T3

<400> 7
ctcgaggcca ccatgggagg attgtcctca aggaaacgcc gttcccatga tgttctgact 60
gtgcaattcc taatthttggg aatgctgttg atgacgggtg gagtgacctt ggtgacgaaa 120
aacagatggt tgctcctaaa tgtgacatct gaggacctcg ggaaaacatt ctctgtgggc 180
acaggaact gcacaacaaa cattttggaa gccaaactact ggtgcccaga ctcaatggaa 240
tacaactgtc ccaatctcag tccgagagag gagccagatg acattgattg ctgggtgctat 300
ggggtggaaa acgttagagt cgcataatgt aagtgtgact cagcaggcag gtctaggagg 360
tcaagaaggc ccattgactt gcctacgcat gaaaacatg gtttgaagac cgggcaagaa 420
aatggatga ctggaagaat ggggtgaaag caactccaaa agattgagag atggttcgtg 480
aggaaccctt tttttgcagt gacagctctg accattgcct accttgtggg aagcaacatg 540
acgcaacgag tcgtgattgc cctactggtc ttggctgttg gtccggccta ctcagctcac 600
tgcatggaa ttactgacag ggatttcatt gagggggtgc atggaggaac ttgggtttca 660
gctaccctgg agcaagacaa gtgtgtcact gttatggccc ctgacaagcc ttcattggac 720
atctcactag agacagtagc cattgataga cctgctgagg cgaggaaagt gtgttacaat 780
gcagttctca ctcatgtgaa gattaatgac aagtgcccca gcaactggaga ggcccaccta 840
gctgaagaga acgaagggga caatgctgtc aagcgcactt attctgatag aggctggggc 900
aatggctgtg gcctatthttg gaaaggagc attgtggcat gcgccaatt cacttgtgcc 960
aatccatga gtttgtttga ggttgatcag accaaaattc agtatgtcat cagagcacia 1020
ttgatgtag gggccaagca ggaaaattgg aataccagca ttaagactct caagtttgat 1080
gccctgtcag gctcccagga agtcgagttc attgggtatg gaaaagctac actggaatgc 1140
cagggtcaaa ctgcgggtgga ctttggtaac agttacatag ctgagatgga aacagagagc 1200
tggatagtgg acagacagtg ggcccaggac ttgaccctgc catggcagag tggaaagtggc 1260
ggggtgtgga gagagatgca tcatcttgtc gaatttgaac ctccgcatgc cgccactatc 1320
agagtactgg ccctgggaaa ccaggaaggc tccttgaaaa cagctcttac tggcgcaatg 1380
agggttacia aggacacaaa tgacaacaac ctttaciaac tacatggtgg acatgtttct 1440
tgcagagtga aattgtcagc tttgacactc aaggggacat cctacaaaat atgcaactgac 1500
aaaatgtttt ttgtcaagaa cccaactgac actggccatg gcaactgttg gatgcaggtg 1560
aaagtgccaa aaggagcccc ctgcaggatt ccagtgatag tagtgatga tcttacagcg 1620
gcaatcaata aaggcatttt ggttacagtt aaccccatcg cctcaaccaa tgatgatgaa 1680
gtgctgattg aggtgaaccc acctthttgga gacagctaca ttatcgttgg aagaggagat 1740
tcacgtctca cttaccagtg gcacaaagag ggaagctcaa taggaaagt gttcactcag 1800
acatgaaag gcgtggaacg cctggccgtc atgggagacg tcgctggga tttcagctcc 1860
gctggagggt tcttcaactc ggttgggaaa ggaattcata cgggtgtttg ctctgccttt 1920
caggggctat ttggcggctt gaactgatct aga 1953

5 <210> 8
<211> 2067
<212> ADN
<213> Virus de la fiebre amarilla

ES 2 605 654 T3

<400> 8
gctagcgcca ccatgggagg attgtcctca aggaaacgcc gttcccatga tgttctgact 60
gtgcaattcc taatthttggg aatgctgttg atgacgggtg gagtgacctt ggtgcgghaa 120
aacagatggt tgctcctaaa tgtgacatct gaggacctcg ggaaaacatt ctctgtgggc 180
acaggcaact gcacaacaaa cattttggaa gccaaagtact ggtgcccaaga ctcaatggaa 240
tacaactgtc ccaatctcag tccgagagag gagccagatg acattgattg ctgggtgctat 300
ggggtggaaa acgttagagt cgcataatgt aagtgtgact cagcaggcag gtctaggagg 360
tcaagaaggc ccattgactt gcctacgcat gaaaaccatg gtttgaagac cgggcaagaa 420
aatggatga ctggaagaat gggtgaaagg caactccaaa agattgagag atggttctgtg 480
aggaaccctt tttttgcagt gacagctctg accattgcct accttgtggg aagcaacatg 540
acgcaacgag tctgtattgc cctactggtc ttggctgttg gtccggccta ctcagctcac 600
tgcatggaa ttactgacag ggatttcatt gagggggtgc atggaggaac ttgggtttca 660
gctaccctgg agcaagacaa gtgtgtcact gttatggccc ctgacaagcc ttcattggac 720
atctcactag agacagtagc cattgataga cctgctgagg cgaggaaagt gtgttacaat 780
gcagttctca ctcatgtgaa gattaatgac aagtgcccca gcaactggaga ggcccaccta 840
gctgaagaga acgaagggga caatgctgtc aagcgcactt attctgatag aggctggggc 900
aatggctgtg gcctatthtg gaaaggagc attgtggcat gcgccaatt cacttgtgcc 960
aaatccatga gtttgtttga ggttgatcag accaaaattc agtatgtcat cagagcacia 1020
ttgatgtag gggccaagca ggaaaattgg aataccagca ttaagactct caagtttgat 1080
gccctgtcag gctcccagga agtcgagttc attgggtatg gaaaagctac actggaatgc 1140
cagggtcaaa ctgctgggtga ctttggtaac agttacatag ctgagatgga aacagagagc 1200
tggatagtgg acagacagtg ggcccaggac ttgaccctgc catggcagag tggaaagtggc 1260
ggggtgtgga gagagatgca tcatcttgtc gaatttgaac ctccgcatgc cgccactatc 1320
agagtactgg ccctgggaaa ccaggaaggc tccttgaaaa cagctcttac tggcgcaatg 1380
agggttacia aggacacaaa tgacaacaac ctttaciaac tacatgggtg acatgtttct 1440
tgcagagtga aattgtcagc tttgacactc aaggggacat cctacaaaat atgcaactgac 1500
aaaatgtttt ttgtcaagaa cccaactgac actggccatg gcaactgtttg gatgcagggtg 1560
aaagtccaa aaggagcccc ctgcaaggatt ccagtgatag tagctgatga tcttacagcg 1620
gcaatcaata aaggcatttt ggttacagtt aaccccatcg cctcaaccaa tgatgatgaa 1680
gtgctgattg aggtgaacct accttttggg gacagctaca ttatcgttgg aagaggagat 1740
tcacgtctca cttaccagtg gcacaaagag ggaagctcaa taggaaagt gttcactcag 1800
accatgaaag gcgtggaacg cctggccgtc atgggagacg tcgctggga tttcagctcc 1860
gctggagggt tcttcaactc ggttgggaaa ggaattcata cgggtgtttg ctctgccttt 1920
caggggctat ttggcggctt gaacctcag acgctgatcc ccatcgctgt ggggtgtgcc 1980
ctggcggggc tggctctcat cgtcctcatc gcctacctcg tcggcaggaa gaggagtcaac 2040
gcaggctacc agactatcta gtctaga 2067

ES 2 605 654 T3

<211> 2079
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre amarilla

<400> 9

gtcgcgcgcta	gcaccatgga	actcgagggc	ggcctgagca	gccggaagcg	gcggagccac	60
gacgtgctga	ccgtgcagtt	cctgatcctg	ggcatgctgc	tgatgacagg	cggcgtgacc	120
ctggtgcgga	agaaccgggtg	gctgctgctg	aacgtgacca	gcgaggacct	gggcaagacc	180
ttcagcgtgg	gcaccggcaa	ctgcaccacc	aacatcctgg	aagccaagta	ctggtgcccc	240
gacagcatgg	aatacaactg	ccccaacctg	agccccagag	aggaaccgga	cgacatcgac	300
tgctggtgct	acggcgtgga	gaacgtgcgg	gtggcctacg	gcaagtgcga	cagcgcgggc	360
agaagccggc	ggtccagacg	cgctattgat	ctccccaccc	acgagaacca	cggcctgaaa	420
accggcagg	aaaagtggat	gaccggccgg	atgggcgagc	ggcagctgca	gaagatcgag	480
cgctggttcg	tgcggaaccc	cttcttcgcc	gtgaccgcc	tgacaatcgc	ctacctggtg	540
ggcagcaaca	tgaccagcgc	ggtggtgatc	gccctgctgg	tgctggccgt	gggccctgcc	600
tacagcgcgc	actgcatcgg	catcaccgac	cgggacttca	tcgagggcgt	gcacggcggc	660
acatgggtgt	ccgccaccct	ggaacaggac	aagtgcgtga	ccgtgatggc	ccccgacaag	720
cccagcctgg	acatcagcct	ggaaaccgtg	gccatcgaca	gacccgccga	ggcccggaaa	780
gtgtgctaca	acgccgtgct	gaccacgtg	aagatcaacg	ataaatgtcc	ctccacagga	840
gaagctcacc	tggccgagga	aaacgagggc	gacaacgcct	gcaagcggac	ctacagcgac	900
5 cggggctggg	gcaatggctg	cggcctgttc	ggcaagggca	gcatcgtggc	ctgcgccaag	960

ES 2 605 654 T3

ttcacctgtg ccaagagcat gagcctgttc gaggtggacc agaccaagat ccagtacgtg 1020
atccgggccc agctgcacgt gggcgccaag caggaaaact ggaacaccag catcaagacc 1080
ctgaagtctg acgccctgag cggcagccag gaagtggagt tcatcggcta cggcaaggcc 1140
aactggaat gccaggtgca gaccgcccgtg gacttcggca acagctatat cgccgagatg 1200
gaaaccgaga gctggatcgt ggaccggcag tgggccagg acctgaccct gccctggcag 1260
agcggcagcg gcggagtgtg gggggagatg caccacctgg tggagttcga gccccccac 1320
gccgccacca tccgggtgct ggccctgggg aaccaggaag gctccctgaa aacagctctc 1380
acaggggcta tgcgggtgac caaggacacc aacgacaaca acctgtacaa gctgcacggc 1440
gggcacgtga gctgccgggt gaagctgtcc gccctgacct tgaagggcac cagctacaag 1500
atctgcaccg acaagatggt ttctgtgaag aaccccaccg acaccggcca cggcaccgtg 1560
gtgatgcagg tgaaggtgcc caaaggcgcc ccttgccgga tccccgtgat cgtggccgac 1620
gacctgacag ccgccatcaa caagggcatc ctggtgaccg tgaaccctat cgccagcacc 1680
aacgacgacg agtgctgat cgaggtgaac ccccccttcg gcgactccta catcatcgtg 1740
ggcaggggcy acagccggct gacctaccag tggcaciaag agggcagcag catcgcaag 1800
ctgttcaccc agacaatgaa gggcgtggag cggctggccg tgatggggga cgtggcctgg 1860
gacttcagct ctgccggcgg attcttcacc tccgtgggca agggcattca caccgtgttc 1920
ggcagcgcct tccagggcct gtttgccggc ctgaacgaat tcacgctgat ccccatcgtc 1980
gtgggtggtg ccctggcggg gctggtcctc atcgtcctca tcgcctacct cgtcggcagg 2040
aagaggagt c acgcaggcta ccagactatc tagggtacc 2079

<210> 10
<211> 3208
<212> ADN

5 <213> Virus de la fiebre amarilla

<400> 10
gtcgactagc atggcgcccc gcagcgcccc gcgaccctg ctgctgctac tgctgttgtc 60
gctgctcggc tcatgcatt gtgcgtcagc agcaatgtt atggtgaaa atggcaacgg 120
gaccgcgtgc ataatggcca acttctctgc tgccttctca gtgaactacg acaccaagag 180
tggccctaag aacatgacct ttgacctgcc atcagatgcc acagtgggtc tcaaccgcag 240
ctcctgtgga aaagagaaca cttctgacct cagtctcgtg attgcttttg gaagaggaca 300
tacactcact ctcaatttca cgagaaatgc aacacgttac agcgttcagc tcatgagttt 360
tgtttataac ttgtcagaca cacaccttt ccccaatgcy agctccaaag aaatcaagac 420
tgtggaatct ataactgaca tcagggcaga tatagataaa aaatacagat gtgttagtgg 480
caccaggtc cacatgaaca acgtgaccgt aacgctccat gatgccacca tccaggcgta 540
cctttccaac agcagcttca gcaggggaga gacacgctgt gaacaagaca ggccttcccc 600

ES 2 605 654 T3

aaccacagcg cccctgcgc caccagccc ctgcctca cccgtgccca agagcccctc	660
tgtggacaag tacaacgtga gcggcaccaa cgggacctgc ctgctggcca gcatggggct	720
gcagctgaac ctcacctatg agaggaagga caacacgacg gtgacaaggc ttctcaacat	780
caaccccaac aagacctcgg ccagcgggag ctgcggcgcc cacctggtga ctctggagct	840
gcacagcgag ggcaccaccg tcctgctctt ccagttcggg atgaatgcaa gttctagccg	900
gtttttccta caaggaatcc agttgaatac aattcttctt gacgccagag accctgcctt	960
taaagctgcc aacggctccc tgcgagcgct gcaggccaca gtcggcaatt cctacaagtg	1020
caacgcggag gagcacgtcc gtgtcacgaa ggcgttttca gtcaatatat tcaaagtgtg	1080
ggtccaggct ttcaagtggt aaggtggcca gtttggtctt gtggaggagt gtctgctgga	1140
cgagaacagc ctcgagggcg gcctgagcag ccggaagcgg cggagccacg acgtgctgac	1200
cgtgcagttc ctgatcctgg gcatgctgct gatgacaggc ggcgtgacct tggcgcgaa	1260
gaacccggtg ctgctgctga acgtgaccag cgaggacctg ggcaagacct tcagcgtggg	1320
caccggcaac tgcaccacca acatcctgga agccaagtac tggcgccccg acagcatgga	1380
atacaactgc cccaacctga gccccagaga ggaaccggac gacatcgact gctggtgcta	1440
cggcgtggag aacgtgcggg tggcctacgg caagtgcgac agcgcgggca gaagccggcg	1500
gtccagacgc gctattgatc tccccacca cgagaaccac ggcctgaaaa cccggcagga	1560
aaagtggatg accggccgga tgggcgagcg gcagctgcag aagatcgagc gctggttcgt	1620
gcggaacccc ttcttcgccc tgaccgcctt gacaatcgcc tacctggtgg gcagcaacat	1680
gaccagcggg gtggtgatcg ccctgctggt gctggccgtg ggccctgcct acagcggcca	1740
ctgcatcggc atcacccgac gggacttcat cgaggcgtg cacggcggca catgggtgtc	1800
cgccaccctg gaacaggaca agtgcgtgac cgtgatggcc cccgacaagc ccagcctgga	1860
catcagcctg gaaaccgtgg ccatcgacag acccgccgag gcccgaaag tgtgctaaa	1920
cgccgtgctg acccacgtga agatcaacga taaatgtccc tccacaggag aagctcacct	1980
ggccgagga aacgagggcg acaacgcctg caagcggacc tacagcgacc ggggctgggg	2040
caatggctgc ggcctgttcg gcaagggcag catcgtggcc tgcgccaagt tcacctgtgc	2100
caagagcatg agcctgttcg aggtggacca gaccaagatc cagtacgtga tccgggcca	2160
gctgcacgtg ggcgccaagc aggaaaactg gaacaccagc atcaagacc tgaagtctga	2220
cgccctgagc ggcagccagg aagtggagtt catcggctac ggcaaggcca cactggaatg	2280
ccaggtgcag accgcccgtg acttcggcaa cagctatata gccgagatgg aaaccgagag	2340
ctggatcgtg gaccggcagt gggcccagga cctgaccctg ccctggcaga gcggcagcgg	2400
cggagtgtgg cgggagatgc accacctggt ggagttcgag cccccccacg ccgccacat	2460
ccgggtgctg gccctgggga accaggaagg ctccctgaaa acagctctca caggggctat	2520
gcgggtgacc aaggacacca acgacaacaa cctgtacaag ctgcacggcg ggcacgtgag	2580

ES 2 605 654 T3

ctgccgggtg aagctgtccg ccctgaccct gaagggcacc agctacaaga tctgcaccga 2640
caagatgttc ttcgtgaaga accccaccga caccggccac ggcaccgtgg tgatgcaggt 2700
gaagtgccc aaaggcggcc cttgccggat ccccgtgatc gtggccgacg acctgacagc 2760
cgccatcaac aagggcatcc tggtgaccgt gaacctatc gccagcacca acgacgacga 2820
ggtgctgatc gaggtgaacc cccccttcgg cgactcctac atcatcgtgg gcaggggcca 2880
cagccggctg acctaccagt ggcacaaaaga gggcagcagc atcggcaagc tgttcaccca 2940
gacaatgaag ggcgtggagc ggctggccgt gatgggggac gtggcctggg acttcagctc 3000
tgccggcgga ttcttcacct ccgtgggcaa gggcattcac accgtgttcg gcagcgcctt 3060
ccaggccctg tttggcggcc tgaacgaatt cacgctgatc cccatcgtg tgggtggtgc 3120
cctggcgggg ctggtcctca tcgtcctcat cgcctacctc gtcggcagga agaggagtca 3180
cgcaggctac cagactatct aggggtacc 3208

<210> 11

<211> 2079

<212> ADN

5 <213> Virus de la fiebre amarilla

<400> 11

gtcgcagcta gcaccatgga actcgaggga gggctgagca gcagaaaacg acggagccat 60
gatgtgctga ctgtgcagtt tctgatcctt gggatgctgc tgatgacggg aggcgtgaca 120
cttgtgagga agaataggtg gctgctgctc aatgtgactt ccgaggacct ggggaaaacc 180
tttagcgtgg gaacgggtaa ctgtaccaca aacatactcg aagctaagta ctggtgcca 240
gattcaatgg agtacaattg tccaaacctg agcccagggg aagaacctga tgacatagac 300
tgctgggtgct acggagtcga aaacgtcaga gtggcttacg gtaagtgcga cagcgcagga 360
cgcagccgtc ggagtaggag agctatagac ctgccgacac acgagaacca cggcttgaaa 420
acacggcagg agaagtggat gacaggcagc atgggagaga gacaactgca aaagatcgag 480
cggtggttcg ttcggaatcc cttcttcgca gttacggcgc tgactatagc ctatttggtg 540
ggctccaaca tgactcagag agtggtgata gcccttctgg ttctggccgt ggggcccgcc 600
tatagcggcc actgcatcgg gattaccgac agggatttca ttgaaggcgt gcacggaggg 660
acctgggtgt ctgccacact cgaacaggat aagtgcgtga cagttatggc acccgacaaa 720
cctagccttg atatcagttt gaaaccgtc gcgatagacc gtccctgccga ggcagggaaa 780
gtgtgctaca acgctgtgct gacgcacgtg aagatcaacg ataagtgtcc ctctacaggc 840
gaagcgcacc tggcagagga gaacgagggg gacaacgcct gcaagcgcac ttacagcgac 900
aggggttggt gaaacggctg tggcctgttt ggcaaagggt ccatcgttgc ttgtgctaag 960
ttcacctgtg ccaaatccat gtcacttttc gaggtggatc agactaagat tcaatacgtg 1020
attogagcac agctgcacgt gggagcgaaa caagagaact ggaatacctc aatcaagact 1080

ES 2 605 654 T3

ctgaagtctg acgcactgag tggtagccag gaagtcgagt ttatcggcta cgggaaagca 1140
 accctggagt gtcagggtgca gacagcagtg gactttggga atagctacat agcagagatg 1200
 gaaacagaat cctggatcgt ggaccgtcag tgggctcagg atctgaccct tccttgcaaa 1260
 agtggatcag gcggtgtgtg gagagagatg catcacttgg ttgaatttga gccaccgcac 1320
 gctgctacca ttcgggtcct ggccttgggc aatcaggagg gcagtctgaa aactgccctg 1380
 accggagcca tgcgggtgac aaaagatacg aacgacaaca acctctacaa actgcacggc 1440
 ggacacgtca gctgcagagt gaaactgtca gactgacct tgaaggggac tagctacaag 1500
 atttgcacag ataagatggt ctctgtgaag aatcccactg atactgggca cggcactgtg 1560
 gtgatgcaag tgaaggtccc aaaggagacc ccttgtcgaa tccctgtgat tgtggctgac 1620
 gatctgaccg ctgctatcaa caaaggaatc ctggttaccg tgaatcccat cgcgagtaca 1680
 aacgacgacg aagtctctgat cgaggtgaat ccaccctttg gcgacagcta catcattgtc 1740
 gggaggggag acagcaggct gacgtatcag tggcaciaag aagggtcctc aatcgggaag 1800
 ctgtttacc agacaatgaa aggcgtggag cgactggccg tgatgggaga cgtggcctgg 1860
 gacttctcca gtgccggcgg ctctttacc tccgtgggca agggaatcca taccgtgttt 1920
 ggctcagcct ttcagggact gtttgggtgt ttgaacgaat tcacgctgat ccccatcgct 1980
 gtgggtggtg ccctggcggg gctggctcctc atcgtcctca tcgcctacct cgtcggcagg 2040
 aagaggagtc acgcaggcta ccagactatc tagggtacc 2079

<210> 12

<211> 3208

<212> ADN

5 <213> Virus de la fiebre amarilla

<400> 12

gtcgactagc atggcgcccc gcagcgcccc gcgaccctg ctgctgctac tgctgttctg 60
 gctgctcggc ctcatgcatt gtgcgtcagc agcaatgttt atggtgaaaa atggcaacgg 120
 gaccgcgtgc ataatggcca acttctctgc tgccttctca gtgaactacg acaccaagag 180
 tggccctaag aacatgacct ttgacctgcc atcagatgcc acagtgggtc tcaaccgcag 240
 ctctgtgga aaagagaaca ctctgacctc cagtctcgtg attgcttttg gaagaggaca 300
 tacactcact ctcaatttca cgagaaatgc aacacgttac agcgttcagc tcatgagttt 360
 tgtttataac ttgtcagaca cacacctttt cccaatgcg agctccaaag aatcaagac 420
 tgtggaatct ataactgaca tcagggcaga tatagataaa aaatacagat gtgttagtgg 480
 caccaggtc cacatgaaca acgtgaccgt aacgctccat gatgccacca tccaggcgtg 540
 cctttccaac agcagcttca gcaggggaga gacacgctgt gaacaagaca ggccttcccc 600
 aaccacagcg cccctgccc caccagccc ctgcacctca cccgtgcca agagcccctc 660
 tgtggacaag tacaacgtga gggcaccaca cgggacctgc ctgctggcca gcatggggct 720

ES 2 605 654 T3

gcagctgaac ctcacctatg agaggaagga caacacgacg gtgacaaggc ttctcaacat 780
caacccaac aagacctcgg ccagcgggag ctgcgccgcc cacctggtga ctctggagct 840
gcacagcgag ggcaccaccg tcctgctcct ccagttcggg atgaatgcaa gttctagccg 900
gtttttccta caaggaatcc agttgaatac aattcttctt gacgccagag accctgcctt 960
taaagctgcc aacggtccc tgcgagcgct gcaggccaca gtcggcaatt cctacaagtg 1020
caacgcggag gagcacgtcc gtgtcacgaa ggcgttttca gtcaatatat tcaaagtgtg 1080
ggtccaggct ttcaaggtgg aaggtggcca gtttgctct gtggaggagt gctgctgga 1140
cgagaacagc ctcgagggag ggctgagcag cagaaaacga cggagccatg atgtgctgac 1200
tgtgcagttt ctgatccttg ggatgctgct gatgacggga ggcgtgacac ttgtgaggaa 1260
gaataggtgg ctgctgctca atgtgacttc cgaggacctg gggaaaacct ttagcgtggg 1320
aacgggtaac tgtaccacaa acatactcga agctaagtac tggtgcccag attcaatgga 1380
gtacaattgt ccaaacctga gcccgagga agaacctgat gacatagact gctggtgcta 1440
cggagtcgaa aacgtcagag tggcttacgg taagtgcgac agcgcaggac gcagccgtcg 1500
gagtaggaga gctatagacc tgccgacaca cgagaaccac ggcttgaaaa cacggcagga 1560
gaagtggatg acaggcagga tgggagagag acaactgcaa aagatcgagc ggtggttcgt 1620
tcggaatccc ttcttcgag ttacggcgct gactatagcc tatttggtgg gctccaacat 1680
gactcagaga gtggtgatag cccttctggt tctggccgtg gggcccct atagcicca 1740
ctgcatcggg attaccgaca gggatttcat tgaaggcgtg cacggaggca cctgggtgtc 1800
tgccacactc gaacaggata agtgcgtgac agttatggca cccgacaaac ctagccttga 1860
tatcagtttg gaaaccgtcg cgatagaccg tcctgccgag gccaggaaag tgtgctacaa 1920
cgctgtgctg acgcacgtga agatcaacga taagtgtccc tctacaggcg aagcgcacct 1980
ggcagaggag aacgaggggg acaacgcctg caagcgcact tacagcgaca ggggttgggg 2040
aaacggctgt ggcctgtttg gcaaaggttc catcgttctt tgtgctaagt tcacctgtgc 2100
caaatccatg tcacttttcg aggtgatca gactaagatt caatacgtga ttcgagcaca 2160
gctgcacgtg ggagcgaaac aagagaactg gaatacctca atcaagactc tgaagtctga 2220
cgcaactgag ggtagccagg aagtcgagtt tatcggctac gggaaagcaa ccctggagtg 2280
tcaggtgcag acagcagtg actttgggaa tagctacata gcagagatgg aaacagaatc 2340
ctggatcgtg gaccgtcagt gggctcagga tctgacctt ccttggcaa gtggatcagg 2400
cgggtgtg agagagatgc atcacttggg tgaatttgag ccaccgcag ctgctaccat 2460
tcgggtcctg gccttgggca atcaggaggg cagtctgaaa actgcctga ccggagccat 2520
gcggtgaca aaagatacga acgacaacaa cctctacaaa ctgcacggcg gacacgtcag 2580
ctgcagagtg aaactgtcag cactgacctt gaaggggact agctacaaga tttgcacaga 2640

ES 2 605 654 T3

taagatgttc ttcgtgaaga atcccactga tactgggcac ggcactgtgg tgatgcaagt	2700
gaaggtccca aaggagagccc cttgtcgaat ccctgtgatt gtggctgacg atctgaccgc	2760
tgctatcaac aaaggaatcc tggttaccgt gaatcccatc gcgagtacaa acgacgacga	2820
agtcctgacg gaggtgaatc caccctttgg cgacagctac atcattgtcg ggaggggaga	2880
cagcaggctg acgtatcagt ggcacaaaga agggtcctca atcgggaagc tgtttaccca	2940
gacaatgaaa ggcgtggagc gactggccgt gatgggagac gtggcctggg acttctccag	3000
tgccggcggc ttctttacct ccgtgggcaa gggaaatccat accgtgtttg gctcagcctt	3060
tcagggactg tttggtggtt tgaacgaatt cacgctgac cccatcgctg tgggtggtgc	3120
cctggcgggg ctggtcctca tcgtcctcat cgcctacctc gtcggcagga agaggagtca	3180
cgcaggctac cagactatct aggttacc	3208

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una vacuna de ADN que es capaz de realizar la coexpresión de la proteína PreM/ME del virus de la fiebre amarilla junto con LAMP, la proteína de asociación con la membrana lisosómica, y de presentar dichas proteínas de antígeno al sistema inmunológico a través de la vía de MHC II, en la que la secuencia de PreM/ME se fusiona con el dominio C-terminal de LAMP y dicha vacuna tiene la SEQ ID NO:8 o una secuencia con más del 80% de homología con esta.
- 10 2.- Una vacuna de ADN que es capaz de realizar la coexpresión de la proteína PreM/ME del virus de la fiebre amarilla junto con LAMP, la proteína de asociación con la membrana lisosómica, y de presentar dichas proteínas de antígeno al sistema inmunológico a través de la vía de MHC II, en la que la secuencia de PreM/ME se fusiona con el dominio C-terminal de LAMP y dicha vacuna tiene la SEQ ID NO:9 o una secuencia con más del 80% de homología con esta.
- 15 3.- Una vacuna de ADN que es capaz de realizar la coexpresión de la proteína PreM/ME del virus de la fiebre amarilla junto con LAMP, la proteína de asociación con la membrana lisosómica, y de presentar dichas proteínas de antígeno al sistema inmunológico a través de la vía de MHC II, en la que la secuencia de PreM/ME se fusiona con el dominio C-terminal de LAMP y dicha vacuna tiene la SEQ ID NO:10 o una secuencia con más del 80% de homología con esta.
- 20 4.- Una vacuna de ADN que es capaz de realizar la coexpresión de la proteína PreM/ME del virus de la fiebre amarilla junto con LAMP, la proteína de asociación con la membrana lisosómica, y de presentar dichas proteínas de antígeno al sistema inmunológico a través de la vía de MHC II, en la que la secuencia de PreM/ME se fusiona con el dominio C-terminal de LAMP y dicha vacuna tiene la SEQ ID NO:11 o una secuencia con más del 80% de homología con esta.
- 25 5.- Una vacuna de ADN que es capaz de realizar la coexpresión de la proteína PreM/ME del virus de la fiebre amarilla junto con LAMP, la proteína de asociación con la membrana lisosómica, y de presentar dichas proteínas de antígeno al sistema inmunológico a través de la vía de MHC II, en la que la secuencia de PreM/ME se fusiona con el dominio C-terminal de LAMP y dicha vacuna tiene la SEQ ID NO:12 o una secuencia con más del 80% de homología con esta.
- 6.- Antígenos de vacuna obtenidos mediante la expresión de una o más de las secuencias genéticas según una de las reivindicaciones 1 a 5.

Figura 1

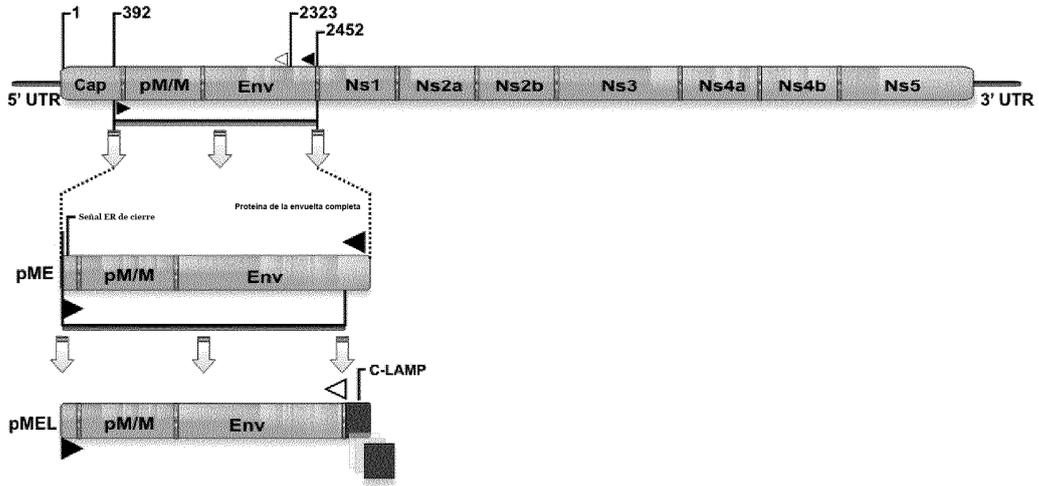


Figura 2

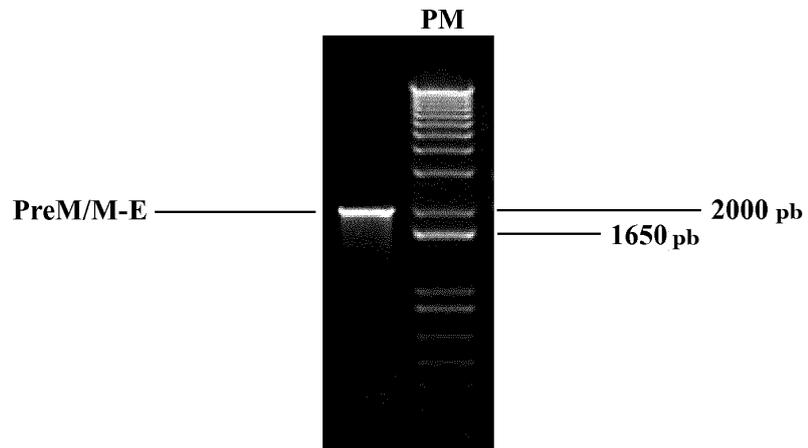


Figura 3

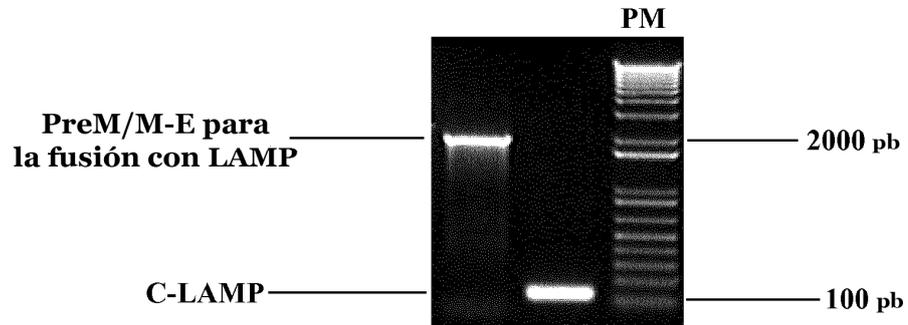


Figura 4

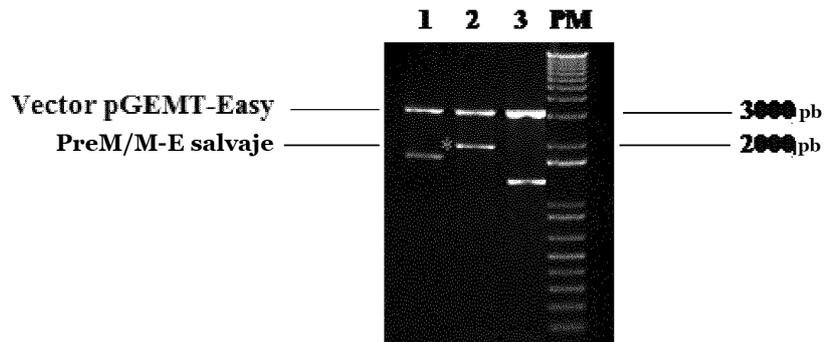


Figura 5

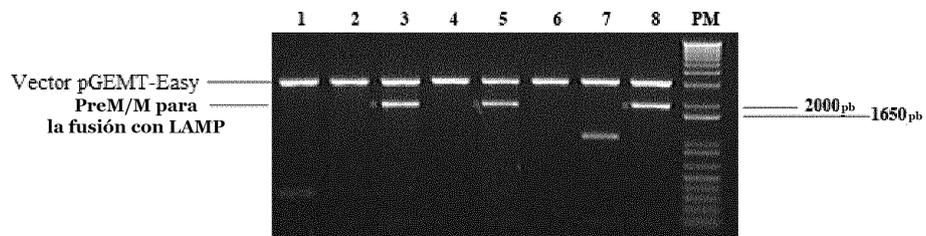


Figura 6

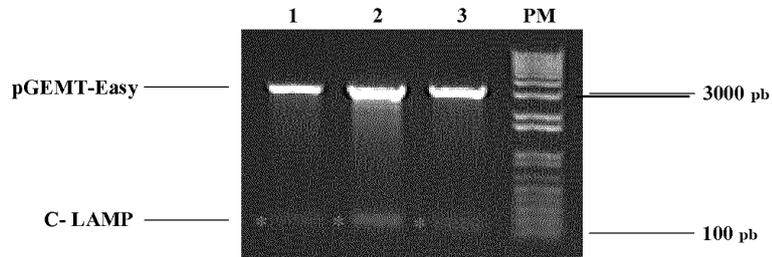


Figura 7

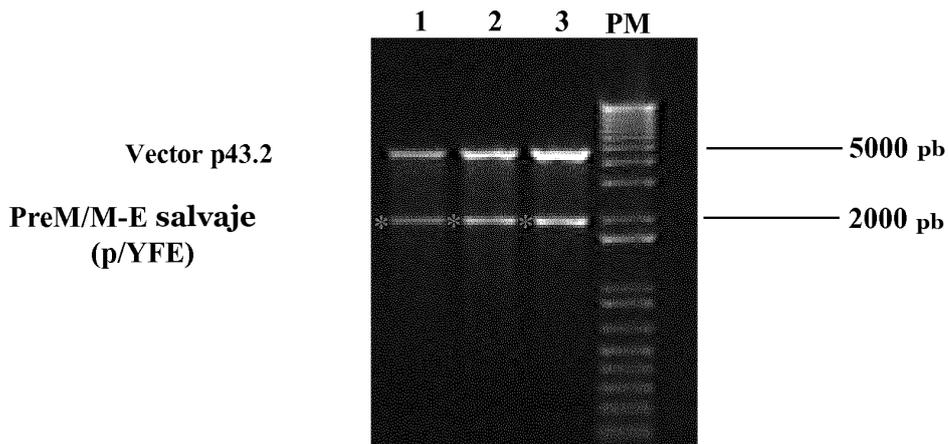


Figura 8

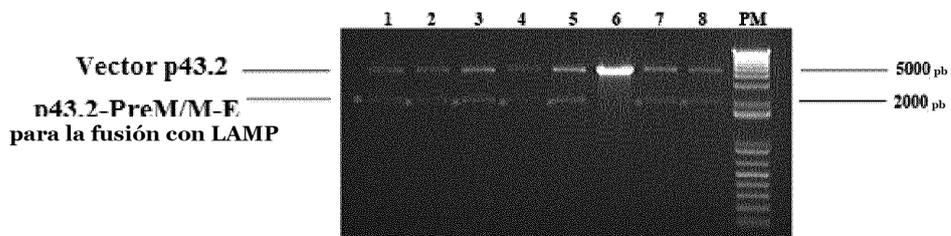


Figura 9

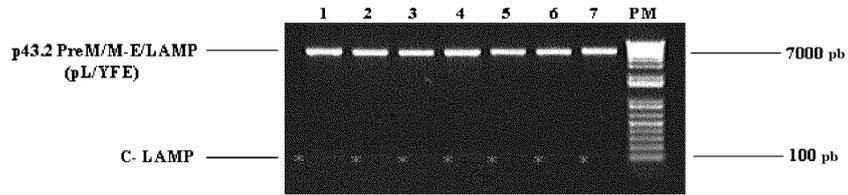


Figura 10

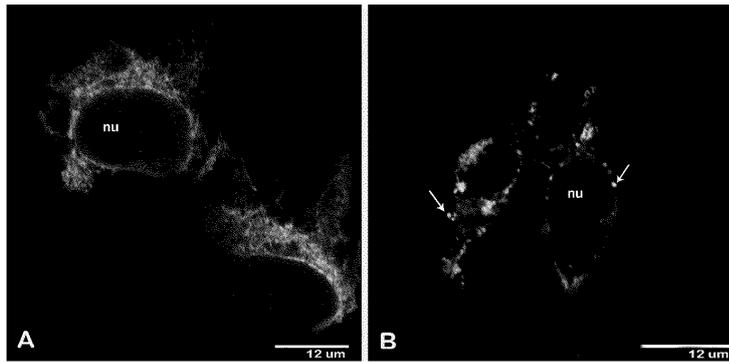


Figura 11

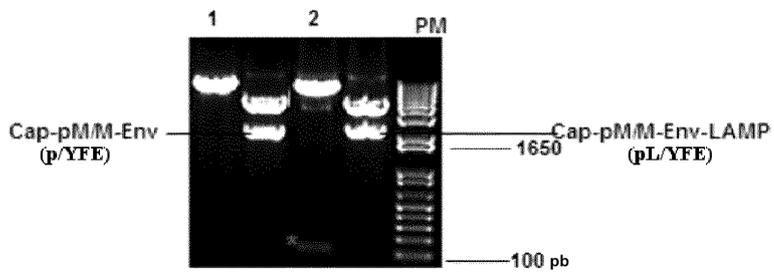


Figura 12

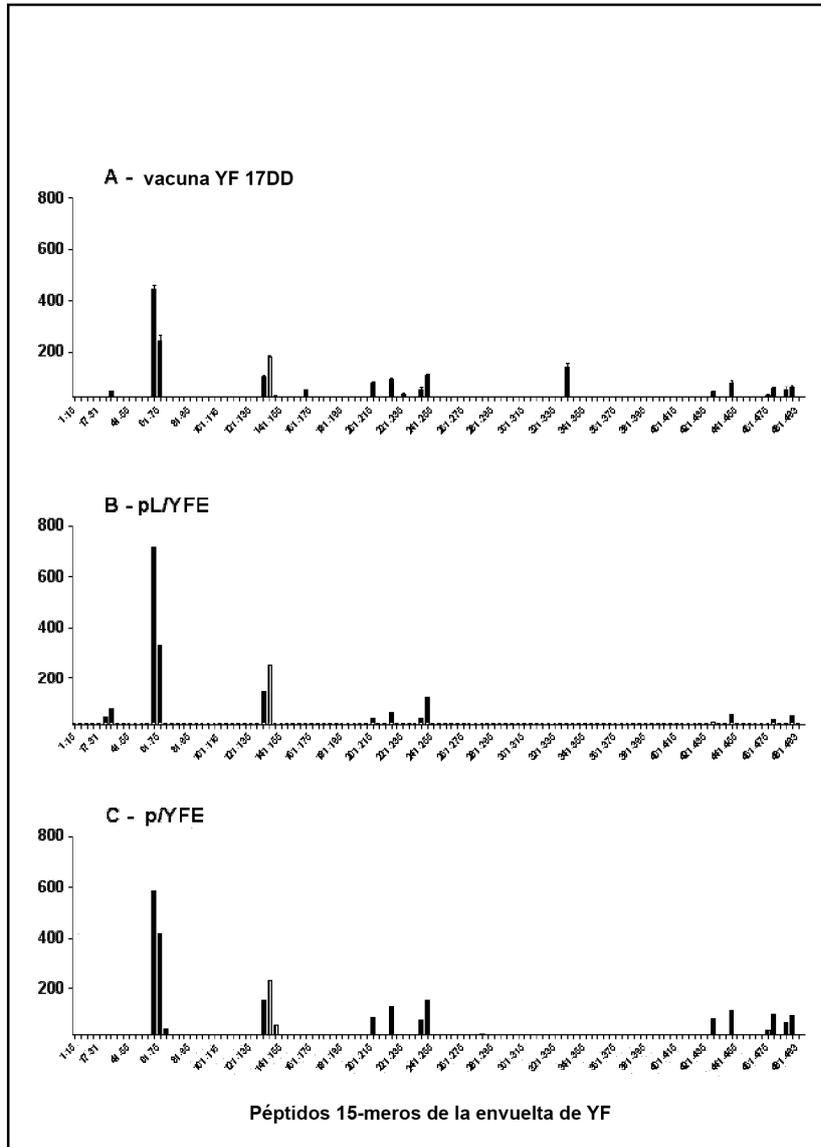


Figura 13

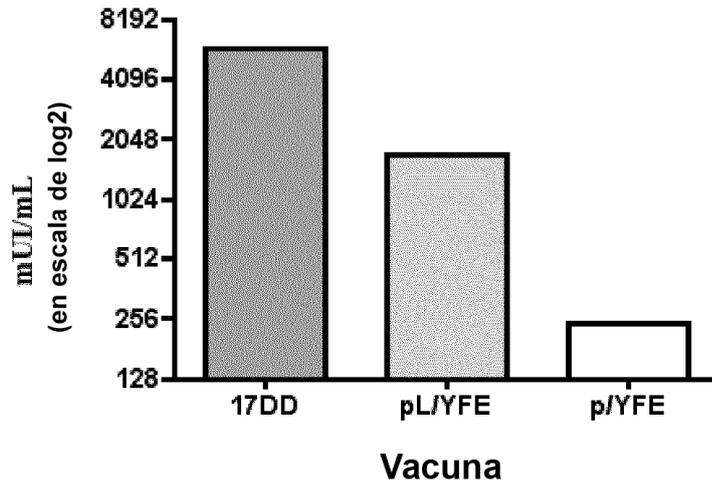


Figura 14

