

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 546**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/145** (2006.01)  
**A61K 39/155** (2006.01)  
**C07K 14/11** (2006.01)  
**C12N 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07255070 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2044947**

54 Título: **Composiciones basadas en MVA y métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra la influenza**

30 Prioridad:

**05.10.2007 GB 0719526**

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

**14.07.2017**

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED  
(100.0%)  
Buxton Court, 3 West Way, Botley  
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**GILBERT, SARAH;  
HILL, ADRIAN y  
MOORE, ANNE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 624 546 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

Composiciones basadas en MVA y métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra la influenza

### Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones y métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra la influenza, en particular una respuesta inmunitaria mediada por células T.

### Antecedentes de la invención

10 Las estrategias de vacunación contra la influenza han sido relativamente constantes durante al menos aproximadamente 20 años. Típicamente, cada vacuna comprende partículas de virus de la gripe inactivadas de aproximadamente tres cepas diferentes. Estas vacunas se administran para inducir respuestas basadas en anticuerpos. Cada año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) selecciona las cepas que considera que representan la mayor amenaza para la salud humana en ese momento. Normalmente se presentan dos decisiones por año, una para cepas del hemisferio norte y una para cepas del hemisferio sur. Después del anuncio, los fabricantes tienen un período corto de tiempo para elaborar las formulaciones de la vacuna de ese año. Esta estrategia conduce a una serie de problemas.

15 En primer lugar, debido a la corta ventana de fabricación, pueden surgir complicaciones en la producción. Se pueden producir retrasos en el sistema, por ejemplo cuando las cepas particulares no están disponibles o cuando es necesario realizar sustituciones. Por otra parte, esta estrategia presenta problemas de nivel superior. Por ejemplo, esta estrategia representa efectivamente una apuesta estadística sobre los serotipos particulares de la influenza que pueden representar la mayor amenaza para la salud humana. Sin embargo, las diversas poblaciones de virus de la gripe cambian dinámicamente con el tiempo. Por lo tanto, el retraso entre la elección de las cepas y la vacunación después de la fabricación puede significar que las formulaciones de la vacuna pueden no representar ya las formulaciones óptimas incluso en el momento de la administración. Además, la escasez de la vacuna es muy común. La razón es que los fabricantes no pueden vender alicuotas en exceso de la vacuna ya que la formulación de la vacuna se actualiza cada año y no hay mercado para la composición del año anterior. Esta sola razón significa que no se puede vacunar a toda la población. Las vacunas tienden a centrarse en los grupos considerados de riesgo. Uno de estos grupos de riesgo son los ancianos. Sin embargo, esta estrategia en sí misma puede ser defectuosa, ya que los estudios que comparan los efectos de la vacunación de los ancianos en riesgo con los efectos de la vacunación de los mismos sujetos junto con cada uno de los individuos con los que tienen contacto demuestran que para ser eficaces, es necesario vacunar a los individuos con los que entran en contacto los pacientes de riesgo para que la estrategia sea eficaz.

20 Además de lo anterior, la biología de los virus de la influenza significa que las proteínas externas del virus cambian con el tiempo. Esto forma parte del comportamiento natural de evasión de defensa del anfitrión del virus. Además, los nuevos serotipos llegan a los seres humanos procedentes de otras especies, tales como especies aviares, por ejemplo, mediante redistribución u otros mecanismos genéticos. Esto conduce nuevamente a serotipos con diferentes proteínas externas. Claramente, con las proteínas externas del virus cambiando continuamente, las esperanzas de un diseño convencional de vacunas que sigan siendo eficaces de año en año son remotas.

25 Las vacunas actuales para la influenza A actúan estimulando la producción de anticuerpos contra la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Dado que estas proteínas son altamente polimórficas, hay muy poca o ninguna protección de subtipo cruzado (o heterosubtípica) y una protección limitada de cepa cruzada incluso dentro de los subtipos. Como se ha señalado anteriormente, son necesarios un rediseño y una refabricación constantes que aumentan el coste de las vacunas, imponen limitaciones en el suministro y lo más importante representan que las vacunas para cepas recién surgidas sólo se pueden producir una vez que las secuencias HA y NA de los virus que presentan la mayor amenaza para la salud humana hayan sido identificadas. La influenza aviar en los seres humanos se trata actualmente con el fármaco antiviral oseltamivir, y este fármaco se está almacenando para su uso en futuras pandemias. Sin embargo, se ha aislado ahora el virus H5N1 resistente al oseltamivir después de la infección en seres humanos, por lo que el uso de este fármaco solo puede no ser suficiente para tratar a individuos infectados o limitar la propagación del virus si se transmite de ser humano a ser humano.

30 De los 59 casos humanos conocidos de influenza H5N1 es sorprendente que la mayoría de las infecciones se hayan encontrado en jóvenes y que la tasa de letalidad entre los menores de 15 años de edad fuera del 89%.

35 La infección natural con el virus de la influenza da como resultado respuestas de células T a NP y M1, pero las vacunas de subunidades que consisten en HA y NA no pueden inducir estas respuestas. En Rusia y en los Estados Unidos se ha concedido la licencia de una vacuna de virus atenuado vivo, adaptado al frío (ca, por sus siglas en inglés), para la inmunización intranasal. Se ha demostrado que las vacunas producidas de esta manera inducen alguna inmunidad de protección cruzada. Se llevaron a cabo pruebas en niños seronegativos vacunados con un virus ca. El nivel de seroconversión a la cepa de la vacuna varió de 41 a 89%, oscilando el nivel de seroconversión a diferentes cepas de 5 a 55%. Por lo tanto, la reactividad cruzada es baja y, al igual que con las vacunas de

subunidades, se utiliza una nueva mezcla de cepas de virus para producir una vacuna cada año. Además, los problemas de seguridad relacionados con la expulsión y liberación ("shedding") de la cepa de la vacuna han dado como resultado que esta vacuna sea aprobada solamente para el grupo de edad 5-49 en los Estados Unidos. Esto excluye dos grupos de riesgo principales que son más mayores o más jóvenes que el rango de edad definido, así como pacientes inmunodeficientes y mujeres embarazadas.

El riesgo de una pandemia mundial de influenza aviar ha generado una preocupación generalizada y justificada. La vacunación presenta una posible medida de control, pero no hay vacuna contra la influenza H5N1 y pruebas recientes de nuevas vacunas para H5N1 en investigación sugieren que se necesitaría una cantidad 12 veces mayor de antígeno por vacuna que con otras vacunas contra la gripe. Esto ha desalentado el desarrollo de nuevas vacunas debido a que las partes productoras están preocupadas porque si no ocurre una pandemia, se quedarán con suministros no vendidos. Otros intentos para resolver estos problemas se han centrado en el uso de coadyuvantes para reducir la cantidad de antígeno necesario. Además, la alta tasa actual de diversificación de las cepas H5N1 sugiere que las vacunas fabricadas ahora pueden diferir tanto en su secuencia de H5 de cualquier cepa pandémica que emerja, que estas vacunas tendrían poca o ninguna eficacia.

Se ha demostrado que los ratones inmunizados con vacunas de ADN que expresan la nucleoproteína (NP) y la matriz (M1) del virus H1N1 están protegidos contra la exposición letal con una cepa H5N1 (Kreijtz et al. 2007 Journal of Infectious Disease vol 195 pág.1598). Utilizando un régimen de inducción de ADN/ refuerzo de adenovirus con vacunas que expresan NP, en ratones se ha demostrado una protección dependiente de células T contra numerosos subtipos de influenza A incluyendo H5N1. Sin embargo, en seres humanos, las vacunas de ADN no son buenos inmunógenos y no refuerzan las respuestas preexistentes.

Recientemente se ha demostrado que los MVA recombinantes que expresan HA o NP de la influenza equina administrados con o sin una inducción de vacuna de ADN inducen anticuerpos, linfoproliferación y producción de interferón gamma en ponis (Breathnach et al. 2004 Veterinary Immunology and Immunopatology vol. 98 págs. 127-136). Sin embargo, se utilizaron dos dosis de refuerzo de MVA, no se revelaron estudios de sensibilización y no se demostró eficacia.

D1 (documento WO2007092792) describe INFLUENZA VACCINE COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

D2 (documento WO2007016598) describe YEAST-BASED VACCINE FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE JIMENEZ G S et al. Human Vaccines 200709 vol. 3, núm. 5 páginas 157 - 164 describen vacunas de ADN de influenza formuladas con vaxfectina (TM) que codifican proteínas virales NP y M2 que protegen a ratones contra la exposición viral letal.

D3 (DORRELL L et al. Vaccine (20000915), vol. 19, núm. 2-3 páginas 327 - 336) describen virus vaccinia Ankara Modificado que reestimula eficazmente los linfocitos T citotóxicos humanos *in vitro*.

D4 (DONNELLY J J et al., VACCINE (19970601) vol. 15, núm. 8 páginas 865 - 868) describen una protección adicional contra la deriva antigénica del virus de la influenza en un modelo de hurón mediante vacunación con ADN.

D5 (KREIJTZ JOOST H C M et al. Journal Of Infectious Diseases (20070601) vol. 195, núm. 11 páginas 1598 - 1606) describen vacunas basadas en virus vaccinia Ankara modificados recombinantes que inducen inmunidad protectora en ratones contra la infección por el virus de la influenza H5N1.

D6 (SCHNEIDER J et al. NATURE MEDICINE (19980401) vol. 4, núm. 4 páginas 397 - 402) describen un aumento de la inmunogenicidad para la inducción de células T CD8+ y la eficacia protectora completa de la vacunación con ADN de malaria reforzando con virus vaccinia Ankara modificado"

La invención pretende superar el problema o los problemas asociados con la técnica anterior.

### **Compendio de la invención**

La técnica anterior se ha referido a la generación de respuestas de anticuerpos contra el virus de la influenza. Estos enfoques de la técnica anterior se han basado lógicamente en la elección como diana de los antígenos externos de las partículas víricas. Sin embargo, esos antígenos externos cambian constantemente a través del tiempo por medio de fenómenos tales como el cambio antigénico, la deriva antigénica, y la introducción de nuevos serotipos, por ejemplo, mediante mecanismos basados en la re-distribución. Por lo tanto, los enfoques basados en la técnica anterior típicamente no logran generar una reactividad cruzada protectora de cepa a cepa. Además, debido al número limitado de cepas que pueden incluirse en cualquier vacuna determinada dada, en el mejor de los casos la protección conferida omite un gran número de virus potencialmente amenazantes. Adicionalmente, los retrasos entre la selección de las cepas potencialmente más amenazantes en un año dado y la fabricación de la vacuna correspondiente significan que los diseñadores de vacunas están luchando constantemente para mantenerse al día, ya que los cambios en las poblaciones virales habrán tenido lugar incluso antes de que las vacunas elegidas sean fabricadas y administradas.

En contraste con los enfoques de la técnica anterior, los autores de la presente invención se han centrado en la generación de inmunidad basada en células. Además de elegir un enfoque de inmunidad basado en células, los autores de la presente invención ilustran que las proteínas internas del virus de la influenza deben utilizarse como componentes de la vacuna. *A priori*, no se esperaría que tales enfoques funcionaran. Una razón es que al elegir los antígenos internos, es más difícil dirigir el virus ya que esos antígenos a menudo estarían "enterrados" o enmascarados por el resto de la estructura del virus. Lo que es más importante, no se espera que la inmunidad basada en células trate eficazmente la patogenicidad de la influenza. La razón es que, en contraste con los enfoques basados en anticuerpos, las células T no atacan al virus libre tal como el virus en el torrente sanguíneo o el tracto respiratorio superior. La inmunidad mediada por células T depende de las células inmunitarias que atacan a las células en el sujeto que realmente están infectadas con el virus. Por lo tanto, en el mejor de los casos se podría esperar que un enfoque basado en células pudiera conducir a una reducción de la gravedad de una infección particular, pero no se esperaría que previniera o mejorara la enfermedad o la infección en sí. Sin embargo, los autores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que tanto estos como otros inconvenientes esperados con un enfoque que implica antígenos internos e inmunidad basada en células se superan con éxito y se produce una vacuna extremadamente eficaz.

La presente invención se basa en estos descubrimientos sorprendentes.

De este modo, en un aspecto, la invención proporciona una composición adecuada para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T frente a un virus de la influenza en un vertebrado, comprendiendo dicha composición un vector viral que comprende ácido nucleico que codifica uno o más epítomos de una o más proteínas internas del virus de la influenza, en donde dicho vector viral es un vector de MVA, en donde dicha composición comprende ácido nucleico que codifica al menos dos de dichos epítomos, siendo al menos un epítomo de cada una de dos o más proteínas internas del virus de la influenza, en donde dichas proteínas internas comprenden nucleoproteína y proteína 1 de la matriz, en donde dichos epítomos se proporcionan en forma de una fusión de nucleoproteína- proteína 1 de la matriz, en donde dichas proteínas internas proceden de la cepa de la influenza H3N2 subtipo A/Panamá/2007/99, para su uso en el refuerzo de respuestas de células T preexistentes contra la influenza.

Convenientemente dichas proteínas están dispuestas en el orden N terminal - nucleoproteína - proteína 1 de la matriz - C terminal.

Convenientemente, dichas nucleoproteína y proteína 1 de la matriz están separadas mediante una secuencia conectora.

Convenientemente, dicha secuencia conectora tiene la secuencia de aminoácidos GGGPGGG.

Convenientemente, la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico que codifica dichas proteínas internas y/o polipéptidos conectores ha sido sometida a optimización de codones para el uso de codones humanos.

Convenientemente, dichos epítomos se proporcionan en forma de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.

Convenientemente, dichos epítomos están codificados por un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2.

Convenientemente, la composición comprende además un coadyuvante.

Convenientemente, la composición induce respuestas de células T a los antígenos tanto NP como M1.

Convenientemente, la composición de dichas respuestas de células T son respuestas de células T CD8+.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición como la descrita anteriormente en la preparación de un medicamento para reforzar las respuestas de células T preexistentes contra la influenza.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende una composición como la descrita anteriormente para reforzar las respuestas de células T de memoria preexistentes a la influenza.

Convenientemente dicha composición induce (o es capaz de inducir (una vez administrada) respuestas de células T a los antígenos tanto NP como M1. Convenientemente, esto significa la inducción de una respuesta de células T a al menos un epítomo NP y a al menos un epítomo M1. Convenientemente dichas respuestas se presentan en un vertebrado. Más convenientemente dichas respuestas se presentan en un primate.

También se describe el uso de una composición como la descrita anteriormente en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición como la descrita anteriormente en la preparación de un medicamento para la influenza.

También se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo dicho método

administrar a dicho sujeto una composición como la descrita anteriormente.

También se describe un método como se ha descrito anteriormente que comprende administrar una primera composición que comprende un vector basado en adenovirus y una segunda composición que comprende un vector basado en MVA.

- 5 Convenientemente dicho sujeto es una especie de primate o aviar. Convenientemente dicho sujeto es un primate tal como un ser humano.

### Descripcion detallada de la invencion

#### Definiciones

- 10 Una cepa particular del virus de la influenza puede estar sujeta a la deriva antigénica y/o al cambio antigénico. El efecto de cualquiera de estos fenómenos es la alteración de los diversos antígenos mostrados por ese virus. En particular, la deriva antigénica se refiere a la situación en la que se producen mutaciones puntuales únicas u otras alteraciones genéticas menores en la secuencia codificante de dichos antígenos. Por el contrario, el desplazamiento antigénico se refiere a la redistribución de una o más de las ocho moléculas de ARN que constituyen colectivamente el genoma del virus de la influenza. Esto tiende a conducir a un intercambio más drástico o al por mayor o al salto de antígenos que los efectos de menor trascendencia mediados por la deriva antigénica. Es importante observar que dentro de una cepa particular, se pueden observar muchas variantes individuales.

Una ventaja de la invención es que al proporcionar una excelente reactividad cruzada, cada variante dentro de una cepa particular es asumida por la respuesta inmunitaria resultante. Esta ventaja deriva del uso de antígenos conservados, tales como NP y/o M1.

- 20 La respuesta inmunitaria inducida se puede caracterizar fácilmente de acuerdo con mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el péptido o los péptidos exactos utilizados en la inmunización se pueden emplear para evaluar la respuesta inmunitaria. Alternativamente, se pueden utilizar otras cepas, tales como cepas estrechamente relacionadas o variantes de la cepa sobre la que se basaron los antígenos, para evaluar la reactividad cruzada o la amplitud de cobertura proporcionada por la inmunización.

- 25 En un aspecto, los antígenos utilizados comprenden (p. ej., consisten en) o derivan de la secuencia de esos antígenos en la cepa H3N2. Este aspecto tiene varias ventajas, tales como la disponibilidad del virus H3N2 como una solución de partida de BPF para experimentos de sensibilización. Además, esta cepa es la cepa de influenza humana más común. Esta cepa se aisló por primera vez en 1999 y, por lo tanto, es un producto aislado ventajosamente reciente.

- 30 El término "derivado de" tiene su significado natural en la técnica. En otras palabras, significa que el epítipo o antígeno se basan o se toman del material de origen del que "derivan". Esto puede ser mediante clonación y manipulación directa de ácido nucleico a partir del material de origen, o es más probable que implique la derivación de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos del material de origen. En semejante realización, el epítipo o antígeno "derivado" del material de origen si comparten identidad de secuencia suficiente con el material de origen, p. ej., si comparten una identidad de secuencia de al menos 60% a nivel de aminoácidos a lo largo de al menos 10 aminoácidos contiguos, adecuadamente una identidad de secuencia de al menos 70% a nivel de aminoácidos, adecuadamente una identidad de secuencia de al menos 80% a nivel de aminoácidos, una identidad de secuencia de al menos 90% a nivel de aminoácidos, adecuadamente una identidad de secuencia de al menos 95% a nivel de aminoácidos, adecuadamente una identidad de secuencia de al menos 98% a nivel de aminoácidos, adecuadamente una identidad de secuencia de al menos 99% a nivel de aminoácidos, adecuadamente una identidad de secuencia de al menos 100% a nivel de aminoácidos. Convenientemente esto se evalúa a lo largo de al menos 10 aminoácidos contiguos, adecuadamente al menos 20 aminoácidos, adecuadamente al menos 40 aminoácidos, adecuadamente al menos 60 aminoácidos, adecuadamente al menos 80 aminoácidos, adecuadamente al menos 100 aminoácidos, adecuadamente al menos 150 aminoácidos, adecuadamente al menos 200 aminoácidos, adecuadamente al menos 300 aminoácidos, adecuadamente a lo largo de toda la longitud de la secuencia de interés. Para los ácidos nucleicos, se aplican los mismos criterios a la identidad de nucleótidos y a los tramos de nucleótidos contiguos. De manera adecuada, se puede tener en cuenta por consiguiente la degeneración del código genético.

- 50 Una ventaja de la invención es que los antígenos utilizados, tales como antígenos internos, están mucho más conservados que los antígenos proteicos externos. Esto tiene el efecto beneficioso de que la eficacia anual de una vacuna de este tipo es significativamente más alta que la de una vacuna basada en antígenos externos.

- 55 Los términos antígenos "internos" y "externos" tienen su significado normal en la técnica. En pocas palabras, se refieren a las localizaciones de los antígenos en/sobre la estructura del virus de tipo salvaje. Un antígeno interno se encuentra típicamente en el núcleo viral o la matriz. Un antígeno externo es uno que está al menos parcialmente expuesto en la superficie de la partícula viral, tal como un antígeno en una superficie disponible o accesible en la superficie. Los antígenos externos se utilizan típicamente para intentar generar respuestas basadas en anticuerpos. Preferiblemente, la invención excluye el uso de antígenos externos. Convenientemente, los antígenos o epítipos de la invención son antígenos o epítipos internos.

Convenientemente los antígenos o epítomos externos se excluyen específicamente de las composiciones de la invención. Convenientemente, el ácido o los ácidos nucleicos de la invención no codifican antígenos o epítomos externos. Convenientemente, el ácido o los ácidos nucleicos de la invención no codifican proteínas externas del virus de la influenza.

- 5 Es una ventaja de la invención que los componentes de la vacuna no necesitan ser cambiados o alterados de un año a otro. Las vacunas basadas en antígenos externos de la técnica anterior requieren una actualización constante de los componentes de la vacuna, típicamente cambiando completamente cada año.

- 10 Es una ventaja de la presente invención que la exposición natural al virus de la influenza se explote ventajosamente mediante las realizaciones de refuerzo de la invención. En otras palabras, los autores de la presente invención ilustran que los individuos con respuestas de células T significativas contra la influenza no se infectan. De hecho, se muestra que este efecto es independiente de si también están presentes o no respuestas de anticuerpos detectables. Por lo tanto, los efectos generados en la presente invención están completamente separados de los que han sido el foco de la técnica anterior hasta la fecha.

- 15 Una ventaja de la invención es que se proporciona protección cruzada entre las cepas. De hecho, al generar respuestas a la nucleoproteína de influenza, se obtiene un efecto protector.

- 20 Aproximadamente 85% de la población humana en general tiene respuestas de células T contra los antígenos de la gripe. Después de aproximadamente 2 a 4 años, las respuestas caen por debajo de un nivel de protección. Estos individuos, por lo tanto, vuelven a ser susceptibles de nuevo y son vulnerables a la infección/reinfección una vez que su respuesta ha disminuido por debajo de los niveles protectores. Un aspecto de la invención implica el refuerzo de las respuestas de células T preexistentes contra el virus de la influenza a niveles protectores o superiores.

- 25 Otro aspecto de la invención se refiere al refuerzo de las respuestas de células T frente a antígenos de influenza a un nivel superior al normal. Por "nivel normal" se entiende el nivel típico o medio de respuestas en un individuo después de la infección. La ventaja de este aspecto es que la respuesta tarda más en decaer o disminuir y por lo tanto la ventana durante la cual el individuo permanece protegido (es decir, mantiene una respuesta de células T en o por encima del nivel de protección) se prolonga ventajosamente. Esto tiene el beneficio de aumentar el intervalo entre los refuerzos que se requieren para mantener una protección eficaz.

#### Inducción-Refuerzo

- 30 Algunos aspectos de la invención implican regímenes de vacunación de inductor-refuerzo. Tales mecanismos son bien conocidos en la técnica. En líneas generales, el inducción-refuerzo se refiere al proceso de inicio de una respuesta inmunitaria ('inducción') y posteriormente estimulación/potenciación/ampliación de esa respuesta ('refuerzo').

Adecuadamente se obtienen mejores resultados cuando los antígenos para la inducción y el refuerzo se solapan (es decir, tienen uno o más antígenos o epítomos en común) o son los mismos.

- 35 Se pueden llevar a cabo apropiadamente inducciones-refuerzos homólogos. Esto significa que los vectores y/o formulaciones para la inducción y el refuerzo o los refuerzos son adecuadamente iguales. Los vectores basados en Vaccinia Ankara Modificado (MVA) se adaptan bien al inducción-refuerzo homólogo ya que no replican en células de mamífero y por lo tanto típicamente no inducen respuestas inmunitarias anti-vector problemáticas en el sujeto. Esto tiene la ventaja de que las dosis subsiguientes (refuerzos) siguen siendo eficaces en lugar de ser mejoradas por las respuestas anti-vector en el sujeto.

- 40 Adecuadamente la inducción refuerzo heteróloga puede proporcionar respuestas mejoradas. La inducción-refuerzo heteróloga describe la administración de diferentes vectores y/o formulaciones para la inducción y el refuerzo o los refuerzos. Muy adecuadamente la inducción-refuerzo heteróloga se refiere a la administración de diferentes vectores para la inducción y el refuerzo o los refuerzos. Un beneficio clave de la inducción-refuerzo heteróloga es la evitación o la reducción de las respuestas anti-vector, lo que a menudo conduce a una mejor respuesta a los refuerzos (heterólogos) que en los enfoques de inducción-refuerzo homólogos, particularmente cuando las inmunizaciones de inducción y el refuerzo se dan en el margen de unas pocas semanas el uno del otro. En enfoques de inducción-refuerzo heterólogos, adecuadamente un vector es un vector basado en adenovirus, y el otro vector es un vector basado en MVA. Convenientemente en los enfoques de inducción-refuerzo heterólogos, adecuadamente la primera composición comprende un vector basado en adenovirus, y la segunda composición comprende un vector basado en MVA.

- 45 Se pueden aplicar múltiples refuerzos. Por ejemplo, una única inducción puede estar seguida de un refuerzo, o de dos refuerzos, o de tres refuerzos, o incluso más. Algunos regímenes pueden comprender una inducción seguida de un mayor número de refuerzos, por ejemplo, refuerzos regulares administrados en momentos específicos (p. ej., cada 3 años, cada 5 años, cada 10 años) a lo largo de la vida del sujeto. Alternativamente, algunos regímenes pueden comprender una inducción seguida de un mayor número de refuerzos, por ejemplo refuerzos regulares administrados bajo condiciones específicas (p. ej., cuando una respuesta ha disminuido a un nivel predeterminado tal como por debajo del umbral de protección) a lo largo de la vida del sujeto.

- En algunos aspectos, la invención se refiere a regímenes de vacunación de 'solo refuerzo'. En estos aspectos, el sujeto tiene una respuesta preexistente en algún nivel, sea o no protector. Esta respuesta preexistente puede haber sido adquirida por una infección previa o actual, o puede haber sido adquirida por vacunación previa. El punto importante es que el sujeto muestra algún tipo de respuesta inmunitaria contra la influenza, de modo que se considera que la vacunación proporcionada de acuerdo con la presente invención es un 'refuerzo'. El MVA es particularmente adecuado para reforzar las respuestas de células T preexistentes, de manera que el vector es adecuadamente MVA. Se considera que una 'inducción' es una vacunación administrada a un paciente que nunca ha estado expuesto al virus de la influenza o que no presenta una respuesta detectable contra la influenza (un sujeto 'no sometido a sensibilización previa' - discutido con más detalle más adelante).
- 5
- 10 Los refuerzos múltiples pueden ser homólogos o pueden ser heterólogos como se ha explicado anteriormente.
- Una ventaja consiste en que la invención dirige las respuestas inmunitarias contra antígenos conservados y proporciona protección cruzada. Juntos, estos efectos proporcionan ventajosamente una protección amplia y una protección estable contra la infección por el virus de la influenza.
- Sujetos no sometidos a sensibilización previa
- 15 Algunos individuos de la población no poseen una inmunidad preexistente al virus de la influenza. Estos individuos pueden ser bebés, o pueden ser adultos que nunca se han enfrentado al virus. Alternativamente, puede haber adultos que se hayan enfrentado previamente al virus, pero para los cuales ha transcurrido tanto tiempo desde que se enfrentaron al virus por última vez que la respuesta ha decaído hasta el punto de ser indetectable. Se considera que tales individuos no han sido sensibilizados previamente.
- 20 Evidentemente, un enfoque solo de refuerzo puede no ser apropiado para producir inmunidad protectora en tales sujetos. Convenientemente se adopta un enfoque de inducción-refuerzo cuando se vacuna individuos no sensibilizados previamente. Esto puede adoptar adecuadamente la forma de una pluralidad de inmunizaciones basadas en MVA, o puede adoptar la forma de una inducción basada en adenovirus seguida de un refuerzo basado en MVA. Se puede emplear cualquier otra combinación adecuada de inducción-refuerzo.
- 25 Una ventaja de la invención es que una sola vacunación (p. ej., una inducción o refuerzo) contra uno o varios antígenos conservados de la influenza puede dar lugar a una respuesta de células T protectora. Este hallazgo inesperado no se prevé a partir de estudios de la técnica anterior, por ejemplo en el caso de la malaria puede requerir años de exposición incluso para producir un efecto semi-protector.
- 30 Con el fin de determinar si un individuo "ha sido sensibilizado previamente" o no con respecto a la exposición al virus de la influenza, se determina la respuesta de las células T a los antígenos de la gripe. Si el individuo no tiene respuestas positivas de células T a ningún antígeno de la influenza, se considerará que esa persona no ha sido sensibilizada previamente. Una respuesta positiva se describe como una respuesta en un análisis ELISPOT que es mayor que la media de la respuesta no específica (de fondo) más tres veces el error típico de la respuesta no específica.
- 35 **Ventajas**
- Para el criterio de los autores de la presente invención, los enfoques y materiales descritos en la presente memoria no se han generado previamente y representan un cambio de etapa con respecto a los enfoques basados en la técnica anterior. Se cree que los enfoques basados en anticuerpos de la técnica anterior neutralizan el virus antes de que se produzca la infección (es decir, el virus ha entrado en el tracto respiratorio superior pero no ha infectado una célula). Se cree que éste es un objetivo clave en la protección de los individuos contra los efectos de una infección por influenza, o incluso en la protección de los mismos frente a la infección en sí. Para ser el sujeto de una respuesta basada en células T, las propias células del sujeto deben ser infectadas. Por lo tanto, la visión en la técnica es que una respuesta inmunitaria mediada por células T no puede prevenir la infección, ya que la infección por una célula anfitriona se considera un requisito previo para la acción de esa respuesta.
- 40
- 45 Se debe observar que de las aproximadamente 50 o más vacunas en el mercado actual, a lo sumo una de ellas parece estar funcionando a través de respuestas basadas en células T. La única vacuna candidata que podría estar funcionando a través de este mecanismo es la vacuna BCG para la tuberculosis, que claramente no es relevante para la influenza.
- 50 La mayor parte de la actividad en la generación de vacunas contra la influenza de la técnica anterior se ha centrado en antígenos de superficie, que son extremadamente variables. Los únicos intentos de utilizar antígenos conservados se basan en la proteína de la matriz M2. La secuencia de aminoácidos de la proteína de la matriz M2 no está de ninguna manera relacionada con la de la proteína de la matriz M1. La proteína M1 consiste en 252 aminoácidos, mientras que la proteína M2 consiste sólo en 97 aminoácidos y por lo tanto contiene pocos epítopos potenciales de células T. La proteína M1 es interna en el virus de la influenza mientras que la proteína M2, que es una proteína del canal iónico, se extiende hasta la superficie del virus. Además, los únicos intentos de utilizar antígenos conservados en una vacuna contra la influenza se han referido a una generación de respuestas basadas en anticuerpos.
- 55

En la técnica anterior, se considera que las respuestas basadas en células T implican una fase de retardo difícil de manejar. Se cree que la razón de esto es que las células T requieren tiempo para multiplicarse. La clara expectativa de una comprensión de la técnica anterior es que no se podría predecir que las células T apropiadas alcanzaran el pulmón lo suficientemente rápido como para prevenir la muerte del sujeto. Por el contrario, las respuestas de anticuerpos son típicamente mucho más rápidas en cuanto a su acumulación. Por otra parte, se considera que las respuestas de anticuerpos se despliegan más rápidamente que las respuestas basadas en células T. Se considera que las células T son lentas, particularmente en la migración hacia o la localización del sitio de acción. Por lo tanto, a partir de una comprensión de la técnica anterior, en el mejor de los casos la expectativa podría ser que la inmunidad basada en células T podría limitar la gravedad de una infección, pero se consideraría incapaz de prevenir o proteger de manera significativa dicha infección. Por el contrario, los autores de la presente invención han demostrado que la inmunidad basada en células T representa una excelente estrategia de vacunación contra la influenza. Además, es una ventaja de la invención que, aunque el tejido o los tejidos diana de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna sean la mucosa respiratoria, se da el caso de que no es necesario aplicar la vacuna a la mucosa sino que se puede utilizar una vía de vacunación intramuscular o intradérmica convencional.

### 15 **Dosificación/administración**

La dosificación puede ser variada por el operario experto. El experto en la técnica puede manejar diferentes regímenes de dosificación. El trabajador experto puede desplegar diferentes regímenes de inducción-refuerzo, particularmente en la vacunación de individuos no sometidos a sensibilización previa.

Adecuadamente se utilizan vacunas de dosis única.

20 Adecuadamente, no se administra coadyuvante con las composiciones de la invención. Convenientemente, las composiciones de la invención no comprenden coadyuvante.

Convenientemente, las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender virus suspendidos (partículas de vectores virales) portadores de ácido nucleico que codifica los antígenos/epítomos de la influenza de la invención. De manera adecuada, el vector viral no comprende polipéptidos de influenza o secuencias de influenza distintos de los que codifican los epítomos/antígenos de interés.

25 Convenientemente, las composiciones comprenden componentes tamponadores en una cantidad eficaz para mantener la integridad del vector o los vectores virales de la invención.

Los excipientes para facilitar la liofilización del virus o para permitir el almacenamiento a temperatura ambiente de la vacuna pueden formar parte de las composiciones adicionalmente.

30 En un aspecto, las partículas virales se pueden mezclar o coadministrar (p. ej., en la misma muestra y/o en el mismo sitio y/o al mismo tiempo) con una o más proteínas tales como HA (hemaglutinina) o NA (neuraminidasa) de influenza. En este aspecto, las composiciones de la invención se pueden mezclar con una o más vacunas contra la influenza convencionales para producir una nueva composición. Estos aspectos tienen la ventaja de inducir una respuesta de anticuerpo paralela que da como resultado una respuesta mixta de anticuerpos basada en células. De ese modo, también se describen composiciones como las descritas anteriormente que comprenden además uno o más antígenos de influenza externos. Por lo tanto, también es posible modificar las composiciones de la invención para que también induzcan anticuerpos contra una o más proteínas externas del virus. Se ha demostrado que MVA colabora con las respuestas de anticuerpos a las proteínas inyectadas con ella y las vacunas vectorizadas con adenovirus de replicación deficiente inducen anticuerpos contra las proteínas expresadas por la vacuna. De este modo, sería posible combinar la amplia protección cruzada obtenida por las células T que reconocen antígenos conservados con la protección completa contra la infección proporcionada por anticuerpos contra los antígenos externos. La combinación de la protección mediada por células T y por anticuerpos en una vacuna debe proporcionar una eficacia equivalente de la vacuna contra la influenza estacional a las vacunas en uso actualmente, con el beneficio adicional de una protección sustancial contra nuevos subtipos a través de las células T que reconocen y destruyen las células infectadas por virus. Los vectores virales tales como MVA pueden tener un efecto coadyuvante. Sin embargo, se puede proporcionar ventajosamente otro coadyuvante - convenientemente tales composiciones mixtas pueden comprender además un coadyuvante tal como un coadyuvante basado en aluminio, p. ej., alúmina o hidróxido de aluminio.

50 Cuando el epítomo o el ácido nucleico que lo codifica están comprendidos por un vector viral, se administran adecuadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$  ufp (unidades formadoras de placas) en una sola dosis. Más adecuadamente se administran  $1 \times 10^7$  o más ufp en una dosis única, lo que tiene la ventaja de aumentar la inmunogenicidad. Más adecuadamente se administran  $5 \times 10^8$  o menos ufp en una sola dosis, lo que tiene la ventaja de evitar los posibles efectos secundarios de las dosis más altas. De ese modo, adecuadamente se administran  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  ufp en una sola dosis. Más adecuadamente se administran  $5 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  ufp en una sola dosis. Adecuadamente se administran  $5 \times 10^7$  ufp en una sola dosis. Adecuadamente se administran  $2,5 \times 10^8$  ufp en una sola dosis.

Adecuadamente dichas dosis son para primates adultos tales como seres humanos. Las dosis para otros sujetos tales como especies aviares o crías de primates tales como seres humanos se pueden determinar a partir de la guía proporcionada.



Adecuadamente, la administración se realiza por cualquier vía adecuada conocida por el experto en la técnica, por ejemplo por medio de una aguja o por medio de la administración de parches transdérmicos. Adecuadamente la administración es por medio de una aguja.

Adecuadamente, la administración no es intravenosa.

- 5 Adecuadamente, la administración es subcutánea, intradérmica o intramuscular. Adecuadamente, la administración es intradérmica o intramuscular, ya que éstas muestran una mejor inmunogenicidad. Adecuadamente, la administración es intradérmica. Lo más adecuadamente, la administración es intradérmica por medio de una aguja.

10 La secuencia concreta de los antígenos utilizados puede variar, por ejemplo si se detecta una "mutación de escape" en un virus de interés. En este escenario, sería deseable cambiar la secuencia específica de uno o más de los antígenos utilizados en la vacunación con el fin de volver a cartografiar la respuesta inmunitaria sobre la variante de escape. Típicamente esto podría implicar el reemplazo de la secuencia de antígeno por una secuencia que incorpora la variante de escape.

15 Convenientemente, se utilizan dos o más antígenos conservados en las composiciones de la invención y dichos antígenos conservados comprenden uno o más de los polipéptidos de la nucleoproteína (NP) y de la matriz 1 (M1) de la influenza y dichos antígenos conservados comprenden polipéptidos tanto de la nucleoproteína (NP) como de la matriz 1 (M1) de la influenza y dichos antígenos conservados comprenden al menos un epítipo de los polipéptidos de la nucleoproteína (NP) como de la matriz 1 (M1) de la influenza.

En principio, se puede emplear cualquier secuencia o secuencias de nucleoproteína/proteína 1 de la matriz capaces de inducir las respuestas de la invención.

- 20 Una ventaja de los diversos constructos de la invención es que ambos antígenos se expresan eficazmente.

Una ventaja de la invención es que los constructos antigénicos no tienen marcadores. La eliminación de genes marcadores tales como la beta-galactosidasa puede desestabilizar los vectores virales. Por ejemplo, los vectores basados en la viruela aviar pueden ser susceptibles de desestabilización mediante la eliminación de los marcadores de beta-galactosidasa que se incluyen típicamente en ellos. Sin embargo, los autores de la presente invención han mostrado sorprendentemente que los vectores sin marcador de acuerdo con la presente invención son de hecho estables y proporcionan una expresión eficaz de los antígenos internos de interés.

Ventajosamente, los antígenos son de la cepa de influenza H3N2 y los antígenos son del subtipo A/Panamá/2007/99 de la cepa de influenza H3N2.

Ventajosamente, los antígenos comprenden una o varias secuencias de antígenos del listado de secuencias.

- 30 Ventajosamente, los antígenos están dispuestos en el orden (extremo N - proteína nuclear - proteína 1 de la matriz - extremo C) de la proteína de fusión de la invención.

Ventajosamente, los antígenos se proporcionan en forma de un único polipéptido ('proteína de fusión'). Esto asegura que los antígenos sean coexpresados.

35 Ventajosamente, los antígenos de la invención están separados por una secuencia conectora. Esto permite un plegamiento superior de la cadena polipeptídica, y ventajosamente da como resultado la presentación correcta de los antígenos de interés.

40 La mayoría de vectores de la técnica anterior implican una secuencia líder. Ésto se utiliza típicamente en vectores basados en la técnica anterior, por ejemplo para proporcionar una señal de secreción para asegurar que el antígeno está disponible para el sistema inmunitario. Alternativamente, se emplean secuencias líder para proporcionar una expresión mejorada. Sin embargo, por el contrario, los constructos de la presente invención no comprenden adecuadamente una secuencia líder. Los constructos de la invención no comprenden adecuadamente una señal de secreción. Es sorprendente que se obtengan una antigenicidad y una expresión de polipéptidos excelentes incluso en ausencia de una secuencia líder.

45 En la técnica anterior, es práctica habitual la eliminación de todos los sitios potenciales de glicosilación de los antígenos de interés. Sin embargo, por el contrario, los autores de la presente invención ilustran que los sitios de glicosilación se deben mantener. De este modo, adecuadamente, los antígenos de la invención conservan sus sitios de glicosilación naturales.

Una ventaja de la invención es que no se utilizan secuencias terminadoras en los constructos de la invención.

50 Convenientemente, el constructo (p. ej., insertos que codifican el epítipo/antígeno) de la invención que incluye los antígenos de interés se puede sintetizar *in vitro*. Por sintetizar *in vitro* se entiende que el ácido nucleico que codifica los antígenos de interés se sintetiza *de novo*, en lugar de estar derivados mediante técnicas basadas en la clonación de una secuencia de ácido nucleico viral real. De manera adecuada, se utiliza la secuencia de aminoácidos deseada como base para sintetizar artificialmente el ácido nucleico de la invención. También se describen uno o varios

constructos (p. ej., insertos codificantes de un epítipo/antígeno) como tales, p. ej., como casetes de ácido nucleico, estén o no presentes en un vector capaz de dirigir su expresión en una célula animal. También se describen la proteína o las proteínas de fusión descritas en la presente memoria.

Ventajosamente, se utiliza la optimización de codones humanos.

- 5 Otra ventaja de la secuencia conectora es que el conector es susceptible a la proteasa. Esto permite ventajosamente separar los dos o más epítopos/antígenos, aliviando ventajosamente de ese modo los efectos de inmunodominancia que se pueden crear mediante el acoplamiento de antígenos.

Con respecto a los antígenos escogidos, o en particular con respecto a las secuencias antigénicas elegidas, claramente se consideran dentro del alcance de la invención las variantes de las secuencias que se han ilustrado. Por ejemplo, se podrían crear moléculas quiméricas que impliquen partes del antígeno o los antígenos de diferentes subtipos. Alternativamente, se podrían introducir mutaciones puntuales con el objetivo de capturar "variantes de escape" del virus como se describe en la presente memoria.

10 Generalmente se considerará que una respuesta inmunitaria ha sido generada por la presente invención si conduce a una duplicación de la respuesta de células T preexistente medida después de la vacunación, o aumenta en más de 200 células específicas por millón por células mononucleares de sangre periférica. En otras palabras, la fuerza de una respuesta de células T se puede medir en un sujeto antes de la vacunación. Después de la vacunación, la respuesta se mide de nuevo. Si esa respuesta al menos se ha duplicado o ha aumentado en más de 200 células específicas por millón por células mononucleares de sangre periférica, se considerará generalmente que la vacunación ha producido una respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención.

20 Una ventaja de la invención es que se utilizan al menos dos antígenos de influenza conservados.

Una ventaja de la invención es que no se utilizan antígenos de influenza externos.

Una ventaja de la invención es que se genera una respuesta de células T "pura".

Una ventaja de la invención es que las respuestas inmunitarias generadas son mejores de lo que se podría haber previsto. De hecho, es este sorprendente efecto el que constituye la base de la presente invención.

25 Es una ventaja de la invención que los constructos de vector que expresan los antígenos de interés se pueden producir sin que se encuentren presentes secuencias marcadoras engorrosas.

También se describe una vacunación de inducción basada en ADN seguida por una vacunación de refuerzo basada en MVA.

30 Una ventaja de la invención es que se evitan los efectos de inmunodominancia. En la técnica anterior, a menudo se experimentan problemas en la generación de buenas respuestas a partir de la vacunación simultánea con dos o más antígenos. Es un beneficio sorprendente de la presente invención que se observen respuestas inmunitarias robustas frente a cada uno de los antígenos utilizados en la vacunación.

También se describe una vacuna contra la influenza para la protección heterosubtípica.

Virus de la influenza

35 Los virus de la influenza son miembros de la familia de virus de ARN Orthomyxoviridae. Se clasifican como tipo A, B o C basándose en las diferencias de antígeno en su nucleoproteína (NP) y proteína de matriz (M1), y los virus de tipo A se subtipifican adicionalmente basándose en la antigenicidad de las glicoproteínas de la superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Actualmente hay 16 subtipos de HA y 9 de NA, y todos los subtipos se mantienen en las poblaciones de aves acuáticas. El genoma de la influenza A consiste en ocho moléculas de ARN de sentido negativo de hebra sencilla, que codifican 11 proteínas.

40 Las infecciones causadas por el virus de la influenza no suelen producir enfermedades en las poblaciones de aves silvestres, pero pueden transferirse de ellas a aves de corral domésticas, donde pueden producirse enfermedades que a veces son mortales, y también pueden causar infecciones en seres humanos. Si el virus después muta o se redistribuye con otro subtipo capaz de transferirse entre los seres humanos, puede surgir una nueva cepa a la que los seres humanos no tienen inmunidad y causar una pandemia. Al menos 40 millones de personas murieron en 1918-19 de 'gripe española' causada por un virus H1N1. Las pandemias subsiguientes en 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) y 1977 (H1N1) fueron causadas cada vez por nuevas cepas surgidas. El virus de 1968 tenía segmentos de HA y PB1 aviares, pero todos los otros segmentos habían sido previamente identificados en los seres humanos. Recientemente, sólo las cepas previamente encontradas en las poblaciones de aves (subtipos H5N1, H9N2 y H7N7) se han transmitido directamente a los seres humanos. Todavía hay poca evidencia de la transferencia de humano a humano de estos subtipos, pero es probable que surjan nuevas cepas y den como resultado una nueva pandemia.

50 Se ha descubierto que el virus vaccinia Ankara modificado recombinante (MVA) induce un aumento drástico de las respuestas de células T preexistentes, sin embargo, se generaron inicialmente. Se refuerzan las respuestas tanto

CD4+ como CD8+. Por lo tanto, se puede utilizar MVA en la invención para reforzar las respuestas de memoria CD8+ existentes que se han inducido mediante la exposición a la influenza. La infección o la vacunación dan como resultado una inducción rápida de las células T efectoras que pueden controlar la infección. Esto está seguido de una fase de contracción con apoptosis de células efectoras y generación de células T de memoria. Es esta población de memoria la que luego se expande para producir una nueva población de células efectoras para controlar cualquier infección subsiguiente. Es importante destacar que la magnitud de la respuesta efectora determina la magnitud de la memoria. Cuando ya existe una respuesta de memoria, el refuerzo con una vacuna altamente inmunogénica no sólo da lugar a una respuesta de células T efectoras, sino que 'restablece' la respuesta de memoria a un nivel superior, dando lugar a un mayor grado de protección en la exposición siguiente.

La mayoría de los adultos de EE.UU. y del Reino Unido tienen niveles detectables de respuestas de células T a los antígenos de la influenza incluyendo NP y M1. De hecho, la alta frecuencia media de células T CD8+ de 0,39% medida por citometría de flujo (y la alta frecuencia de CD27 en estas células que refleja una activación limitada) sugieren que deberían ser fácilmente reforzables por MVA que codifican antígenos de influenza de acuerdo con la presente invención. Incluso las respuestas que pueden ser demasiado bajas para ser cuantificadas de forma fiable por los análisis disponibles actualmente pueden todavía ser reforzadas a niveles elevados mediante una única dosis de MVA recombinante. La expansión de la respuesta de memoria existente de esta manera dará como resultado una mayor respuesta de memoria después de la vacunación con MVA. Una aplicación de la invención es el refuerzo de las respuestas de nivel muy bajo en la mayoría de la población a niveles protectores, de manera que la mayoría de la población está protegida contra la infección en lugar del 33% que se encontraba protegido en un estudio de exposición a influenza. En otra realización, mediante el refuerzo de otros individuos (p. ej., 33% de la población con una protección medible), se pueden amplificar ventajosamente de manera adicional sus respuestas de células T dando lugar a una protección más fuerte y más duradera.

#### Vectores

Se describen vectores virales no replicantes adecuados para su uso en primates, tales como seres humanos. El vector o vectores deben tener la capacidad de dirigir la producción de epítopos (polipéptidos) en una o más células anfitrionas del sujeto en el que se introducen. Esto es importante en la producción de la respuesta inmunitaria mediada por células correctas ya que los epítopos de interés se deben suministrar (p. ej., producidos dentro) en dichas células, y preferiblemente no se exportan o secretan significativamente, para que se alcancen los efectos inmunitarios correctos de acuerdo con la invención. Adecuadamente, el vector es el vector MVA.

MVA es una excelente elección del vector de la vacuna. Como no se reproduce en seres humanos, es incapaz de causar una infección diseminada y no plantea problemas de seguridad. Se fabrica en fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Dado que los huevos embrionados y los CEF son ampliamente utilizados en la fabricación de otras vacunas hay una disponibilidad inmediata de CEF, y el proceso de fabricación de MVA recombinante es simple y ampliable. El uso de MVA recombinante en numerosas pruebas, que han incluido niños pequeños e individuos positivos para el VIH e individuos latentemente infectados con TB, ha dado lugar a una gran acumulación de datos de seguridad y experiencia de fabricación y uso de MVA que expresan diferentes antígenos, todos los cuales apoyan el uso de MVA recombinante como una vacuna de refuerzo de las células T segura e inmunogénica (Moorthy, Imoukhuede et al., 2004, Dorrell, Yang et al., 2005, Webster, Dunachie et al. 2005, Bejon, Mwacharo et al., 2006).

Convenientemente, el vector MVA utilizado es el MVA convencional producido por Anton Mayr después de 570 pases en CEF que se utiliza más comúnmente en la técnica.

Se puede utilizar cualquier vector basado en adenovirus adecuado, tal como los descritos en los documentos WO2005/071093 o WO2006/048215. Adecuadamente, el vector basado en adenovirus utilizado es un adenovirus de simio, evitando de este modo la atenuación de la respuesta inmunitaria después de la vacunación por anticuerpos preexistentes a entidades humanas comunes tales como AdHu5.

Los vectores de adenovirus de simio adecuados incluyen AdCh63 (número de patente WO/2005/071093) o AdCh68 (Cohen et al., J. Gen Virol 2002 83: 151), pero también se pueden utilizar otros. Adecuadamente, el vector de adenovirus tendrá la región E1 suprimida, haciéndolo de replicación deficiente en células humanas. Otras regiones del adenovirus tales como E3 y E4 también pueden ser suprimidas.

De este modo, la invención proporciona un MVA recombinante que expresa antígenos de influenza internos como se define en las reivindicaciones, y el uso del mismo para reforzar las respuestas de las células T a niveles protectores. Aunque la respuesta de las células T efectoras generada después de la inmunización con MVA alcanza un pico rápidamente y luego disminuye durante un período de semanas, la memoria de células T continúa aumentando durante un período de seis meses y es esta respuesta de memoria la que protegerá a los vacunados de la infección subsiguiente y es la respuesta inmunitaria preferida de la invención. También se describe una vacuna de dosis única que proporciona protección cruzada y de subtipo cruzado contra la infección diseminada que proviene tanto de la influenza humana como de la influenza aviar o, al menos, reduce considerablemente tanto los síntomas como la expulsión y liberación del virus si se produce una infección, siempre que algunas respuestas de las células T de memoria hayan sido inducidas por exposición previa (o por vacunación por inducción).

5 Para la vacunación de individuos no expuestos previamente a influenza, se utilizan adecuadamente dos o tres inmunizaciones con MVA recombinante, o una inmunización por inducción con un vector de vacuna alternativo seguido de refuerzo con MVA. Se puede utilizar el uso repetido del mismo MVA recombinante para 'volver a reforzar' las respuestas efectoras. Puesto que el MVA no se replica en células humanas, las respuestas inmunitarias al vector son bajas, y ventajosamente no impiden la reutilización de la misma vacuna.

Convenientemente, el ácido nucleico que codifica los epítomos/antígenos se inserta en el locus TK de MVA.

Convenientemente, el ácido nucleico que codifica los epítomos/antígenos está bajo el control del promotor P7.5 de vaccinia.

#### Respuestas inmunitarias

10 Un elemento clave del enfoque de la invención es que la respuesta inmunitaria se ve obligada a una respuesta mediada por células. Esta es una característica del uso de vectores virales para el suministro de los epítomos/antígenos de interés. Los procedimientos de la técnica anterior se basan en la presentación del antígeno directamente en preparaciones de proteína con o sin coadyuvante. Este tipo de presentación del antígeno conduce a respuestas basadas en anticuerpos. Sin embargo, las composiciones de la invención dirigen la producción de  
15 epítomos o antígenos dentro de las células del sujeto anfitrión. Esto conduce a su presentación a las células T y por lo tanto a la inmunidad mediada por células. Esta es una distinción básica sobre los enfoques basados en la técnica anterior que no producen inmunidad protectora basada en células y que operan a través de la producción de anticuerpos.

20 La protección mediada por las células T no prevendrá la infección inicial de las vías respiratorias superiores por la influenza, lo que la protección dependiente de anticuerpos puede hacer. Sin embargo, tras la vacunación (refuerzo) de acuerdo con la presente invención, la respuesta de las células T de memoria es capaz de expandirse rápidamente para producir células efectoras que destruyen las células infectadas con virus, prevenir la propagación de la infección y limitar los síntomas de la enfermedad.

25 También se describe una vacuna de cepa cruzada y de subtipo cruzado basada en antígenos de influenza internos. Ésta se puede fabricar y utilizar ampliamente porque puede proteger contra la influenza humana (H1N1 y H3N2), así como contra una posible pandemia de H5N1, o una pandemia causada por cualquier subtipo que se encuentra actualmente sólo en especies de aves. Dicha vacuna inductora de células T, por lo tanto, encuentra aplicación en la industria por lo menos por estas razones.

30 Adecuadamente, la respuesta inmunitaria está en un animal, más adecuadamente en un vertebrado, más apropiadamente en una especie aviar (p. ej., aves tales como pollos u otras especies avícolas de la cabaña aviar o domésticas) o un primate, más apropiadamente en un primate tal como un ser humano. Convenientemente el sujeto o los sujetos sobre los que se pone en práctica la invención son vertebrados, más adecuadamente especies avícolas o primates, más adecuadamente primates tales como seres humanos. Convenientemente, los métodos descritos tienen el propósito de inducir respuestas inmunitarias en vertebrados, más adecuadamente en especies avícolas o  
35 primates, más adecuadamente en primates tales como seres humanos.

También se describe el uso de las composiciones de la invención, tales como composiciones de vacunas, en aves. Cuando se utiliza la composición o las composiciones en aves tales como pollos, dicha composición se administra o se suministra adecuadamente *in ovo* o mediante inyección en pollos.

40 Preferiblemente, las respuestas inmunitarias de la invención son respuestas mediadas por células tales como respuestas mediadas por células T.

En un aspecto, la invención no se aplica adecuadamente a especies equinas. En este aspecto, las especies equinas adecuadas se excluyen de la invención.

45 Por supuesto, se debe observar que diferentes individuos responden a epítomos diferentes debido a la restricción del MHC. Por lo tanto, una ventaja de la invención consiste en la utilización de los polipéptidos NP completos y/o M1 completos, es decir, polipéptidos de longitud completa de manera que están abarcados todos los epítomos presentes naturalmente. Los epítomos o antígenos de una o más proteínas de la influenza adicionales se pueden añadir ventajosamente a las composiciones de la invención. Por ejemplo, se puede añadir una proteína de influenza no estructural adicional. Sin embargo, una ventaja de la invención es que la inclusión tanto de NP como de M1 proporciona la cobertura más amplia posible de respuestas naturales, mientras que se minimiza el número de  
50 antígenos utilizados y por lo tanto representa una formulación óptima de acuerdo con la invención.

#### Otras aplicaciones

55 También se describe una composición para generar una respuesta inmunitaria contra un virus de influenza, comprendiendo dicha composición uno o más epítomos de una o más proteínas internas del virus de la influenza. También se describe una composición adecuada para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T contra un virus de influenza, comprendiendo dicha composición uno o más epítomos de una o más proteínas internas

del virus de la influenza. En tales aspectos es importante asegurar que la respuesta es efectivamente la respuesta mediada por células de la invención. Por lo tanto, los epítomos o antígenos deben ser suministrados a las células del sujeto en lugar de suministrarse simplemente de una manera que sólo podría inducir una respuesta de anticuerpos. De este modo, los epítomos o antígenos se suministran adecuadamente en una forma que permite el cruce de la membrana celular o la entrada a las células por otros medios. Esto puede implicar la presentación de los epítomos como proteínas de fusión fusionadas a uno o más dominios de transporte capaces de suministrar los epítomos a la célula o las células del sujeto.

5 También se describen vacunas de dosis única tales como kits que comprenden una composición de la invención para reforzar las respuestas a la influenza de las células T de memoria preexistentes.

10 También se describen vacunas de dosis múltiples tales como kits que comprenden dos o más composiciones de la invención para su administración a sujetos no inducidos o que no han sido previamente expuestos.

15 Las respuestas inmunitarias inducidas por la composición o las composiciones inmunogénicas descritas pueden tener otras utilidades además de la inducción de inmunidad protectora. Estas incluyen la generación de reactivos tales como células T útiles en análisis de diagnóstico, la generación de células T útiles en protocolos de transferencia adoptivos, p. ej. para inmunoprolifaxis y/o inmunoterapia, y el uso de la composición o las composiciones inmunogénicas para evaluar la inmunocompetencia del sujeto al que se administran.

La invención se describe a continuación a modo de ejemplos. Estos ejemplos pretenden ser ilustrativos y no pretenden limitar las reivindicaciones adjuntas. Se hace referencia a los siguientes dibujos:

#### Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2, cuya secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos de A/Panama/2007/99 del SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico ha sido optimizada para el uso de codones humanos. La estructura consiste en la nucleoproteína (NP) seguida por el conector (secuencia de aminoácidos gggpggg) seguido por la matriz 1 (M1).

25 Las Figuras 2 y 3 muestran diagramas de barras de la inmunogenicidad de MVA-NP+M1 en ratones. La Figura 2 muestra la inmunogenicidad de la región NP de la fusión NP+M1. La Figura 3 muestra la inmunogenicidad de dos epítomos, péptidos 57 y 64, en la secuencia codificante de M1, que sorprendentemente también induce una respuesta de células T a pesar de estar fusionada con el extremo C de la secuencia codificante de NP mediante una secuencia conectora no natural.

La Figura 4 muestra un diagrama de flujo del procedimiento FDP para producir vectores de Adenovirus.

30 La Figura 5 muestra una fotografía de productos de PCR visualizados.

La Figura 6 muestra un diagrama de barras de respuesta inmunitaria.

La Figura 7 muestra un diagrama de barras de respuesta inmunitaria.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Vacunas inductoras de células T para la gripe

35 Fundamento:

Identidad de la nucleoproteína (NP)  
92% entre las cepas H3N2 y H1N1  
91% entre las cepas H3N2 y H5N1

40 Identidad de M1 (matriz)  
95% entre las cepas H3N2 y H1N1  
93% entre las cepas H3N2 y H5N1

45 Diseño de la vacuna: MVA-gripe  
Antígeno: proteína de fusión NP:M1  
Secuencia H3N2 utilizada  
Conector flexible entre NP y M1  
Secuencia codificante total de 758 aminoácidos  
Insertado en el locus TK de MVA  
Promotor P7.5 de Vaccinia  
Ningún gen marcador

50 La mayoría de los adultos han estado expuestos a la influenza y tienen cierta memoria de células T contra NP y M1. La inmunización con MVA recombinante que expresa NP y M1 refuerza estos a niveles potencialmente protectores.

La vacuna está fabricada con BPF.

La prueba en Fase I utiliza voluntarios sanos, somete a ensayo las respuestas de las células T antes y después de la inmunización con MVA.

Comparación de dosis  $5 \times 10^7$  ufp i.d. (n = 12) y  $2,5 \times 10^8$  ufp i.d. (n = 12)

## 5 Estudio en Fase IIa

Elegir la dosis de inmunización de acuerdo con lo indicado más arriba.

Inmunizar a 12 personas con bajos títulos de anticuerpos

Sensibilizar estos 12 más 12 controles utilizando H3N2, cepa disponible sensible a oseltamivir. Medir la expulsión y liberación de virus en lavados nasales.

10 La vacuna se puede formular como un producto combinado.

Ejemplo 2: Constructo de epítipo preferido

El constructo del epítipo se prepara de acuerdo con la secuencia mostrada en la Figura 1. En este ejemplo, el ácido nucleico se sintetiza *in vitro* y a continuación está listo para la clonación en un sistema de suministro tal como un vector viral, p. ej., MVA.

15 Ejemplo 3: Inmunogenicidad de MVA-NP+M1 en ratones.

Se inmunizaron grupos de cuatro ratones BALB/c con  $1 \times 10^6$  ufp de MVA-NP+M1 intradérmicamente, o 50 µg de una vacuna de ADN que expresaba el mismo inserto NP+M1 intramuscularmente seguido de  $1 \times 10^6$  ufp de MVA-NP+M1 intradérmicamente dos semanas más tarde. Dos semanas después de la inmunización con MVA, se sometieron a ensayo los bazo para determinar las respuestas de células T al péptido inmunodominante TYQRTRALV (residuos de aminoácidos 147-155 de NP) en un análisis ELISPOT de interferón gamma como describen Schneider, J., et al., (1998) *Nat Med* 4, 397-402.

20 Los resultados se representan en la Figura 2 como la media de cuatro ratones, y la respuesta generada por la vacunación para el péptido TYQRTRALV (péptido de la gripe) se muestra en comparación con la respuesta de fondo no específica (sin péptido). En estos ratones que no han sido previamente expuestos a la influenza, MVA es capaz de inducir una respuesta de células T a NP, como se muestra por el grupo con MVA solo. En ratones que se inducen primero utilizando una vacuna de ADN, la respuesta es reforzada a un nivel más alto por MVA-NP+M1.

25 También se miden las respuestas a dos péptidos adicionales, ambos derivados de M1 (Figura 3). El péptido 57 contiene el epítipo VFAGKNTDL y el péptido 64 contiene el epítipo LYRKLKREI. "Neto" indica la respuesta específica del péptido menos el fondo.

30 Por lo tanto, los autores de la presente invención demuestran que en la misma cepa de ratón se pueden inducir respuestas de células T tanto al antígeno NP como al antígeno M1 utilizando el constructo NP-M1 de acuerdo con la presente invención en un vector MVA. Así, a pesar del conector artificial entre los antígenos y a pesar de la posibilidad de que se produzca la competición antigénica, los autores de la presente invención demuestran que ambos antígenos son ventajosamente inmunogénicos para la inducción de células T y, en particular, con el vector MVA.

35 Ejemplo 4: Medición de las respuestas de células T a NP y M1 en pruebas clínicas

Medición de inmunogenicidad de MVA-NP+M1 en voluntarios:

40 Las respuestas de las células T a la nucleoproteína y a la proteína 1 de la matriz de la influenza A se pueden medir utilizando un análisis ELISPOT para enumerar las células T secretoras de interferón gamma (INF-gamma) de muestras de células de sangre periférica, después de la estimulación con reservas de péptidos solapantes que abarcan la secuencia completa de NP y M1. Las respuestas específicas a cada una de las reservas se añaden juntas para alcanzar la respuesta total de las células T a estos dos antígenos. La respuesta promedio a estos dos antígenos en adultos del Reino Unido se encuentra en la región 100 - 200 células secretoras de INF-gamma por millón de PBMC.

45 Durante la prueba clínica de MVA-NP+M1, la respuesta preexistente a NP+M1 se mide en dos puntos temporales previos a la vacunación, a continuación una semana después de la vacunación además de puntos temporales posteriores. El refuerzo satisfactorio de la respuesta de las células T mediante la vacunación dará como resultado el aumento de esta respuesta típicamente en más de 200 células secretoras de INF-gamma por millón de PMBC a típicamente más de 500 células secretoras de INF-gamma por millón de PMBC.

50 Ejemplo 5: Una nueva vacuna contra la influenza para la inmunidad heterosubtípica.

Visión de conjunto:

El riesgo de una pandemia mundial de influenza aviar ha generado una preocupación generalizada y justificada. Las vacunas diseñadas para inducir anticuerpos contra la hemaglutinina H5 presentan una evidente medida potencial de control, pero la actual alta tasa de diversificación de las cepas H5N1 sugiere que las vacunas elaboradas actualmente pueden diferir tanto en su secuencia de H5 de cualquier cepa pandémica que emerja que estas vacunas tendrían poca o ninguna eficacia.

Sin embargo, las células T citotóxicas específicas para las proteínas internas NP y M1 muestran una elevada reactividad cruzada entre las cepas y entre los subtipos, lo que refleja la conservación de 92-94% de las proteínas internas. Las células T protectoras son inducidas por la infección por influenza, y 90% de la población adulta del Reino Unido tiene células T de memoria contra 'antígenos de la gripe', pero el nivel de células efectoras disminuye rápidamente por debajo de lo necesario para la protección.

Los autores de la presente invención realizarán una prueba clínica utilizando virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) que exprese antígenos internos de la gripe para reforzar las respuestas de memoria preexistentes de nuevo a niveles protectores. Las pruebas clínicas anteriores con MVA que expresan antígenos de la malaria y de la tuberculosis han demostrado que es seguro y altamente eficaz en el refuerzo de las respuestas de las células T en los seres humanos. Durante la prueba, se evaluarán las respuestas de reacción cruzada para determinar el potencial de la nueva vacuna para proteger contra H5N1, así como contra H3N2 y H1N1.

Ejemplo 6: Fabricación y prueba

El MVA recombinante puede ser construido como anteriormente, y fabricado comercialmente por IDT, Alemania.

Diseño experimental y métodos: Diseño de vacunas

La composición de este ejemplo es un virus MVA recombinante que expresa la nucleoproteína (NP) de influenza A fusionada a la proteína de matriz (M1) a través de un conector flexible (GGGPGGG) para formar un solo marco de lectura abierto (NPM1). Hay muy poco polimorfismo de estas secuencias entre los productos aislados de influenza A. NP es 92% idéntica entre las cepas H3N2 y H1N1, y 91% idénticas entre las cepas H3N2 y H5N1. M1 es 95% idéntica entre las cepas H3N2 y H1N1, y 93% idéntica entre las cepas H3N2 y H5N1. Este bajo nivel de variación parece permitir una fuerte reactividad cruzada de las células T. Para la comparación, la secuencia del antígeno TRAP utilizado en la vacuna contra la malaria de los autores de la presente invención difiere en 8% de la secuencia de la cepa de sensibilización, y se observaron una reactividad cruzada inmunológica y una protección cruzada entre cepas excelentes. Sin embargo, los autores de la presente invención eligieron la secuencia de H3N2 para esta prueba, ya que esta es la secuencia para la que la mayoría de las personas tendrán respuestas de células T de memoria. Los autores de la presente invención midieron las respuestas inmunitarias a NP y M1 de este subtipo, al otro subtipo H1N1 humano común y al subtipo H5N1 aviar.

La expresión del antígeno es dirigida por el promotor temprano/tardío de Vaccinia P7.5 y el antígeno se inserta en el locus de la timidina quinasa (TK) de MVA. Tales constructos similares han sido ampliamente sometidos a ensayo para determinar la estabilidad genética y no se ha detectado evidencia de inestabilidad. Cuatro vacunas de MVA recombinantes existentes expresan todas la beta-galactosidasa de *Escherichia coli* como un gen marcador, insertado adyacente al antígeno y expresado a partir del promotor tardío P11 de Vaccinia. Esto permite la identificación del virus recombinante para la selección de la placa durante el aislamiento inicial del virus recombinante, y como es dirigido por un promotor tardío no se expresa bien en células de mamífero después de la inmunización. Sin embargo, los autores de la presente invención han desarrollado ahora metodologías utilizando la selección dominante transitoria de marcadores de proteínas fluorescentes que permiten el aislamiento de MVA recombinante carente de cualquier marcador, y de esta manera se produce el constructo NPM1. Esto requiere después la adaptación de los análisis de control de calidad existentes para su uso con virus sin marcador.

Una empresa de fabricación de BPF (Imstoffwerke Dessau Tornau (IDT), Alemania) puede producir MVA-NPM1 bajo contrato y cualquier nuevo análisis que se requiera para la producción llevada a cabo de un MVA sin marcadores.

Fabricación

Se genera MVA-NPM1 como antes, y se caracteriza por secuenciación del inserto y de las regiones flanqueantes del virus. La inmunogenicidad del constructo se comprueba mediante un análisis de potencia en ratones, en el que se comprueban las respuestas a un epítipo de células T conocido en ratones (el péptido restringido H-2Kd NP 147-155 TYQRTRALV). A continuación se puede suministrar una provisión de siembra del virus a IDT, que prepara un banco maestro de semillas del virus y produce un lote clínico en viales listos para su uso. El control de calidad de la vacuna se puede llevar a cabo por IDT, y los estudios de toxicología se pueden llevar a cabo por una organización de investigación contractual conforme a las BPL. Estos estudios generan los datos requeridos para una Aplicación de Pruebas Clínicas (CTA) a MHRa, que puede ser respaldada por extensos datos de seguridad de pruebas clínicas previas de vacunas de MVA recombinante.

## Estudio de seguridad e inmunogenicidad

Los voluntarios adultos sanos pueden ser reclutados de la población local. No es necesario que estos sean seleccionados para el estado de inmunización frente a vaccinia ya que se ha descubierto que la inmunización previa contra la varicela > 20 años antes tiene efectos mínimos sobre la inmunogenicidad para MVA. En estudios de seguridad e inmunogenicidad, 12 personas recibirán una dosis de  $5 \times 10^7$  ufp intradérmica, y 12 recibirán una dosis de  $2,5 \times 10^8$  ufp. El grupo de dosis baja se completará y recibirá la aprobación del control de seguridad independiente de la prueba antes de comenzar el grupo de dosis alta. En las pruebas con voluntarios con MVA 85A (tuberculosis) que habían recibido previamente la vacuna BCG y a continuación se les había administrado una dosis única de MVA 85A de  $5 \times 10^7$  ufp, la respuesta de células T al antígeno 85A se reforzó a niveles extremadamente altos y permaneció elevada durante más de un año (McShane, Pathan et al., 2004). Sin embargo, en las pruebas de vacunas contra la malaria, las dosis más altas de MVA dieron como resultado respuestas de células T más altas (McConkey, Reece et al., 2003). Por lo tanto, este estudio inicial pondrá a prueba si una sola dosis baja, o una sola dosis alta, de MVA-NPM1 provoca un refuerzo significativo en las respuestas de células T a los antígenos codificados en ella, en una población de estudio que se espera que tenga alguna inmunidad preexistente a la influenza A (véanse las consideraciones estadísticas a continuación).

Además de los análisis de seguridad sanguínea de rutina (como los utilizados en muchos de los estudios con MVA anteriores de los autores de la presente invención) se llevarán a cabo análisis ELISPOT con IFN-gamma tanto *ex vivo* (para medir la respuesta efectora) como en cultivo (para medir la respuesta de memoria) sobre sangre extraída de los voluntarios en su visita de selección y el día de la inmunización, para tener dos medidas separadas de las respuestas pre-existentes en los voluntarios. Después de la vacunación se tomará sangre de los voluntarios 1, 3, 8 y 24 y 52 semanas después de la vacunación y de nuevo se llevarán a cabo análisis ELISPOT con IFN-gamma *ex vivo* y en cultivo así como citometría de flujo. Preferiblemente se llevan a cabo los análisis de calidad BPCL completos para estas respuestas de células T. Para los epítomos seleccionados, se dispone de tetrámeros de tipos HLA de clase I y éstos se utilizarán para fenotipificar las células T CD8+ inducidas. Los autores de la presente invención evalúan la reactividad cruzada de subtipos agrupando péptidos que están completamente conservados entre los subtipos H3N2, H1N1 y H5N1 y elaborando grupos específicos de los subtipos para permitir la cuantificación de las reacciones cruzadas de subtipos.

## Estudio de eficacia

Siempre que se observe un refuerzo significativo de las respuestas inmunitarias después de la inmunización, los autores de la presente invención procederán a continuación a un estudio de eficacia, también en voluntarios sanos. Los estudios de sensibilización con influenza fueron realizados de manera segura por la Common Cold Research Unit en Salisbury durante muchos años y proporcionan una opción para la evaluación rápida de la eficacia de las nuevas vacunas. La dosis de MVA-NPM1 que se va a utilizar se elige después de revisar los datos de seguridad e inmunogenicidad y las discusiones con el supervisor de seguridad de la prueba. Los voluntarios que tienen niveles de anticuerpos muy bajos o ausentes para la cepa de virus de sensibilización serán seleccionados, con el fin de minimizar la confusión del estudio de eficacia por anticuerpos preexistentes. Los voluntarios se inmunizarán y controlarán como para el estudio de inmunogenicidad, y luego se les administrará el virus de la influenza A infecciosa intranasalmente tres semanas después de la inmunización. Hay instalaciones en el Center for Clinical vaccinology and Tropical Medicine (CCVTM), Oxford, para albergar a seis voluntarios en habitaciones para pacientes de presión negativa contenida en cualquier momento. Por lo tanto, cuatro grupos de seis voluntarios (tres inmunizados, tres controles) serán sensibilizados y seguidos por separado. El virus utilizado para la sensibilización será del subtipo H3N2, y será sensible al oseltamivir. El lote que se utilice se habrá producido bajo condiciones BPF por Berna Biotech, y ya se ha proporcionado con seguridad a 200 personas.

Un estudio estadounidense reciente describió irregularidades cardíacas clínicamente insignificantes en voluntarios jóvenes sanos sometidos a una sensibilización con influenza (Ison, Campbell et al., 2005). El estudio se llevó a cabo después de que un sujeto en un estudio previo desarrollara una disfunción miocárdica temporal después de la sensibilización con influenza. Se dijo que este sujeto no tenía antecedentes de anomalías cardíacas, pero de hecho debería haber sido identificado en situación de riesgo debido al tratamiento con antraciclinas que había recibido. Teniendo esto en cuenta, los autores de la presente invención solamente reclutarán voluntarios menores de 40 años. El escrutinio de voluntarios incluirá una historia médica personal y de fármacos, así como una historia familiar para identificar cualquier riesgo residual de problemas del músculo cardíaco o del canal heredados.

Los lavados nasales se tomarán de los voluntarios a la misma hora cada día durante seis días y la cantidad de expulsión y liberación de virus se medirá tanto por métodos de cultivo viral como por PCR en tiempo real. Los voluntarios tendrán acceso 24 horas al cuidado del médico y la enfermera de la prueba, y seguirán teniendo acceso al personal de la prueba después de regresar a casa el día 10 de la prueba. Todos los voluntarios serán tratados con oseltamivir los días 9 y 10 o antes, si existe alguna preocupación clínica. Se tomará sangre para los análisis ELISPOT 8 y 24 semanas después de la vacunación (5 y 21 semanas después de la sensibilización) para examinar el efecto de la infección sobre las respuestas de células T de los voluntarios tanto inmunizados como de control.

Para maximizar la cantidad de información obtenida de las pruebas de sensibilización de influenza, se medirán las respuestas de células T a todos los antígenos de la gripe en muestras de sangre tomadas en tres puntos temporales



(antes de la inmunización, después de la inmunización y después de la sensibilización). Al estudiar la respuesta total de las células T a la gripe, así como a los antígenos incluidos en la vacuna utilizando las técnicas actualmente disponibles, los autores de la presente invención se basarán en los estudios realizados hace 20 años para aumentar la comprensión y confirmar la validez del enfoque de vacunación de los autores de la presente invención y/o determinar la conveniencia de incluir un antígeno diferente en la vacuna como se ha descrito anteriormente.

#### Vietnam

Como NP y M1 están tan altamente conservadas entre las cepas de la influenza A, se espera que si la vacuna protege contra la sensibilización con las cepas que han circulado en los seres humanos, también protegerá contra la influenza aviar. Dado que la sensibilización con cepas H5N1 no se llevará a cabo por razones de seguridad y éticas, un enfoque alternativo para abordar esta cuestión es probar si MVA-NPM1 reforzará las respuestas de células T en los supervivientes de la gripe aviar, lo que indicaría que los epítomos conservados o con reactividad cruzada pueden ser reforzados por la vacuna. En colaboración con la Wellcome Trust Unit en Ho Chi Minh City, Vietnam, dirigida por Jeremy Farrar, que ha tratado y estudiado una gran proporción de casos de influenza aviar en el mundo hasta la fecha, los autores de la presente invención llevarán a cabo un estudio de inmunogenicidad en Vietnam en el que 12 supervivientes de la gripe aviar y 12 individuos que han tenido recientemente gripe humana serán inmunizados. Los análisis ELISPOT se llevarán a cabo en reservas de péptidos, agrupados en epítomos conservados, epítomos específicos de H1N1 y epítomos específicos de H5N1, para evaluar la reactividad cruzada así como la respuesta total.

#### Consideraciones estadísticas

Para los estudios iniciales de seguridad e inmunogenicidad, se requeriría un grupo de 12 voluntarios para detectar un aumento de 400 unidades formadoras de manchas por millón de células (ufm/millón) medidas mediante el análisis ELISPOT con interferón gamma, a partir de un valor de referencia (por ejemplo por debajo de 200 a 600, con un nivel de significación de 5% y una potencia de 90%), si la desviación típica de los cambios es inferior a 420 (como cabría esperar basándose en los datos generados en las pruebas de vacunas contra la malaria y la tuberculosis). Para cada dosis, los autores de la presente invención someterán a ensayo si un aumento en las respuestas de las células T sigue a la vacunación. Utilizando esta información y los datos sobre los efectos secundarios en cada una de las dosis, los autores de la presente invención seleccionarán a continuación la dosis que se vaya a utilizar en el estudio de eficacia.

Para el estudio de eficacia, el análisis inicial se basará en la división de los sujetos en 'excretadores' y 'no excretadores' basándose en la detección del virus de la influenza en los lavados nasales. Un estudio de 12 pacientes en cada brazo tendría un poder de 80% (nivel de significación de 5%) para detectar un cambio de excreción de 90% en los controles con respecto a sólo 16% en el brazo vacunado (es decir, una eficacia de la vacuna superior a 83%). El estudio tendría mayor poder para detectar cambios en la duración de la excreción.

#### Ejemplo 7: Preparación de vacunas de AdCh que expresan la proteína de fusión NP+M1

##### Generación de vectores adenovirales que expresan la proteína de fusión NP+M1

Los vectores adenovirales de replicación defectuosa son vectores extremadamente potentes para el suministro de vacunas genéticas. También son vectores seguros ya que sólo pueden replicar en líneas celulares que expresan la proteína E1 de adenovirus (p. ej., HEK 293). Infectan células de mamíferos y expresan el antígeno insertado, pero no pueden propagarse a otras células y causar una infección diseminada. Los vectores de Ad pueden producirse en condiciones BPF a gran escala mediante cultivo en células 293 y purificación del virus mediante cromatografía o centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Los vectores de Ad son altamente eficaces en la inducción de respuestas de células T *de novo* (Maeda, West et al., 2005).

De los más de 50 subtipos de adenovirus humanos conocidos, el más utilizado es el serotipo 5, un adenovirus del subgrupo C (adenovirus humano 5), que induce rápidamente respuestas inmunitarias protectoras de vida prolongada. Es probable que la inmunogenicidad excepcional de estos vectores de Ad refleje su capacidad para expresar altos niveles de productos transgénicos (dirigidos en la mayoría de los vectores por el potente promotor de CMV), para activar las células del sistema inmunitario innato, para transducir las células dendríticas inmaduras que conducen su maduración en células presentadoras de antígenos, para lograr una presentación de antígenos de larga duración al no inducir la apoptosis de las células transducidas. Sin embargo, la inmunidad anti-adenovirus preexistente y en particular los anticuerpos neutralizadores que reducen la absorción celular de los vectores adenovirales, puede reducir significativamente las respuestas de la vacuna y representa una limitación importante para el uso satisfactorio de serotipos comunes de Adenovirus (Fitzgerald, Gao et al., 2003 Shiver 2003). La infección adenoviral es endémica en la población humana y más de 50% de los sujetos humanos tienen anticuerpos neutralizadores del Adenovirus 5. Para superar este obstáculo, se ha construido un gran número de vectores de Ad del mismo propietario novedosos derivados de chimpancés que: i) tienen una baja o nula seroprevalencia en la población humana; ii) pueden cultivarse eficazmente en líneas celulares productoras derivadas de seres humanos; iii) tienen una potencia inmunológica comparable a la del Adenovirus humano del grupo C en ratones y primates (Solicitud de Patente: "Chimpanzee Adenovirus vaccine carriers". PCT: WO 2005/071093 A2; Prioridad: 2004-

538799P; 23 enero de 2004).

Los autores de la presente invención generarán dos vectores de Ad de chimpancés que no presentan reactividad cruzada que codifican la fusión NP+M1 de la influenza bajo el control de un promotor fuerte - tal como IE de CMV - y con la secuencia de poliadenilación (AdCh-NP+M1). Las señales de Kozak y terminación de la traducción óptimas se introducirán para aumentar la expresión. Los vectores se someterán a ensayo para determinar la productividad, la estabilidad, la capacidad para dirigir la expresión de la fusión NP+M1 tras la infección de líneas celulares susceptibles y la inmunogenicidad en ratones.

Para comprobar la expresión de los antígenos seleccionados, las células HeLa se infectarán con los vectores, se prepararán extractos celulares y se analizarán mediante transferencia Western. Para comprobar la estabilidad genética, el ADN de los clones independientes de los vectores se extraerá después de pases seriados en las líneas celulares susceptibles y se analizará mediante análisis de restricción. Se seleccionará a continuación un vector de Ad para la producción mediante BPF, después de que se disponga de información sobre estabilidad, rendimiento e inmunogenicidad de los dos constructos.

Producción y caracterización de lotes pre-BPF y BPF de vacunas de adenovirus

Se prepararán y caracterizarán lotes preclínicos y clínicos de vectores de Ad. La producción del lote de calidad clínica del vector AdCh-NP+M1 se realizará en condiciones BPF (Buenas Prácticas de Fabricación). El cultivo de células y virus se establecerá con el procedimiento Wave Bioreactor® (Wave Biotech), un biorreactor patentado para cultivo celular. En este dispositivo, el cultivo celular se realiza en bolsas de plástico pre-estériles. Estas bolsas - llamadas Cellbags® - son biorreactores de un solo uso. Este diseño elimina la necesidad de limpieza, esterilización y validación asociada, haciendo de este un sistema ideal para aplicaciones BPF. Se utilizará un sencillo procedimiento de fabricación que implique la expansión celular en Cellbags®.

Purificación de un lote BPF de AdCh-NP+M1. El objetivo del desarrollo del procedimiento de purificación es establecer un procedimiento escalable y rentable capaz de producir adenovirus de alta calidad con bajo contenido de ADN residual (<100 pg/dosis) y altamente infeccioso (<100 pv/UI). Se utilizará un procedimiento altamente robusto y suficientemente bien comprendido utilizando el vector hAd6 (Adenovirus 6 humano) que codifica las proteínas no estructurales (NS) del VHC. Se pueden requerir cambios menores (y se podrían aplicar rápidamente) para purificar otros serotipos. Debido a que la suspensión celular está planeada para originarse a partir de biorreactores Wave (2x10 L), los autores de la presente invención utilizarán el procedimiento de purificación definido como Procedimiento de Desarrollo Final (PDF) (Figura 4). En resumen, el procedimiento consiste en la lisis con detergente para liberar el vector de Ad de las células y potencialmente para inactivar agentes adventicios. Además, la presencia de detergente durante todo el procedimiento minimiza la asociación del virus con el ADN de la célula anfitriona.

A continuación, el ADN de la línea celular (HEK 293) se hace precipitar de manera selectiva utilizando un detergente catiónico. El producto lisado precipitado se aclara a continuación mediante filtración en profundidad. En la siguiente etapa, las proteínas de la célula anfitriona, los componentes del virión sin ensamblar, las micelas de detergente y la nucleasa se eliminan parcialmente mediante ultrafiltración utilizando la filtración de flujo tangencial. A continuación se utiliza la cromatografía de intercambio aniónico para purificar el virus a partir de componentes celulares y virales residuales. La etapa final de filtración de flujo tangencial intercambia el virus al tampón de formulación y sirve como una etapa de refinado, eliminando de manera eficaz las proteínas residuales y el ADN cuando es necesario. A continuación, se podría utilizar una etapa de cromatografía de flujo ortogonal para proporcionar una liberación teórica adicional de priones/virus. La filtración en condiciones estériles completa el procedimiento. Se toman muestras del producto purificado para las pruebas de control de calidad y se congela hasta su formulación.

Pruebas analíticas para lotes BPF de vacunas de Adenovirus. Se desarrollarán pruebas específicas para comprobar la identidad, la potencia, la pureza y el carácter de la vacuna AdCh-NP+M1, después del cultivo y la purificación.

(1) Identidad. La identidad del vector de Ad se confirmará mediante análisis con endonucleasa de restricción del ADN viral purificado y mediante ELISA de células de mamífero infectadas con virus cultivadas *in vitro*. Para el análisis de restricción, el ADN viral digerido se marcará en el extremo con P<sup>33</sup>-dATP, se fraccionará por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa, y se visualizará por autorradiografía.

(2) Potencia. Se desarrollará un análisis de potencia mediante la tecnología QPCR (Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa). Este análisis podría ofrecer las ventajas de precisión, rendimiento y simplicidad. La concordancia de este análisis con el análisis DICT<sub>50</sub> clásico ya se demostró para los vectores basados en hAd6.

(3) Pureza y residuos. Los lotes BPF se someterán a ensayo para determinar el ADN residual, con un análisis capaz de cuantificar con precisión los niveles bajos del ADN de la línea celular en los graneles de vacunas y en los recipientes finales. El carácter y el funcionamiento de este análisis tienen un interés considerable para los organismos reguladores cuya concurrencia con el uso de la línea celular susceptible con un fenotipo transformado está dotada del transgen E1A que proporciona la transcomplementación requerida para el E1A del vector. Los datos derivados de este análisis se complementarán con estudios que caracterizan el ADN residual para determinar la presencia de secuencias de E1A completas. El enfoque de los autores de la presente invención para la caracterización de las secuencias de E1A completas residuales consiste en centrar el análisis sobre el ADN de los

graneles antes y después de la adición de la nucleasa Benzonasa utilizando la tecnología de PCR anidada de un solo tubo para proporcionar una cuantificación de la multiplicidad de aclaramiento de E1A completa residual.

5 (4) Carácter. Los adenovirus se caracterizarán por una variedad de métodos virológicos clásicos, incluyendo microscopía electrónica de transmisión, sedimentación por gradiente de densidad, SDS/PAGE. Las preparaciones purificadas deben estar exentas de contaminación externa por microscopía electrónica, compuesta de partículas virales esencialmente intactas con un componente menor de cápsides virales vacías cuando se analizan por centrifugación en gradiente de densidad.

10 Estudios de toxicología con vacunas de adenovirus. El lote de BPF de vector de Ad se someterá a ensayo para determinar la seguridad en un panel de análisis que incluirán los que se enumeran a continuación. Cada estudio implicará la inyección intramuscular de la vacuna utilizando una concentración de aproximadamente  $10^{11}$  partículas virales/mL, o la concentración más alta que se vaya a utilizar clínicamente.

15 (A) Distribución en tejidos en rata. Este análisis está diseñado para investigar la distribución en el tejido del vector. Se administrará una dosis única de vector de Ad a un número constante de ratas inyectando en cada cuádriceps 250 µl de una suspensión que contiene  $10^{11}$  partículas virales/ml en cada cuádriceps. Un día y 8 días después, los animales serán sacrificados para realizar la evaluación por necropsia de la distribución de la vacuna en el tejido. Los niveles de ADN del vector en diversos tejidos se determinarán mediante PCR convencional y PCR cuantitativa con fluorescencia en tiempo real (TaqMan®).

20 (B) Estudio de toxicidad de dosis única y repetida en ratas. El análisis está diseñado para investigar la toxicidad potencial que surge de la administración única o repetida de la vacuna. Se administrarán tres dosis de vector de Ad, separadas 2 semanas entre sí, a un número constante de ratas inyectando 250 µl de una suspensión que contiene  $10^{11}$  partículas/ml en cada cuádriceps. Catorce días después de la tercera dosis se realizarán una necropsia completa y un examen histológico, junto con un análisis hematológico.

Optimización de la producción de la vacuna de MVA y preparación del virus de la influenza

Optimización de la producción de MVA NP+M1.

25 La vacuna MVA-NP+M1 se construye como anteriormente. Se ha demostrado que esto es inmunogénico en ratones (véase más arriba). La vacuna se puede producir utilizando fibroblastos de embrión de pollo primarios cultivados en botellas rodantes, con purificación de la vacuna con almohadilla de sacarosa. Estos son métodos que se han utilizado anteriormente en la técnica y permiten la optimización de un procedimiento escalable. La producción de la  
30 vacuna también se puede realizar utilizando una línea celular inmortal y un procedimiento de purificación escalable (Filtración de Flujo Tangencial o FFT). Esto permitirá el desarrollo clínico adicional de la vacuna para proceder sin impedimento, y también generará material bien caracterizado para su uso en los estudios preclínicos descritos en esta solicitud. El cambio de producción para utilizar una línea celular inmortal tiene una clara ventaja ya que el fabricante de la vacuna ya no dependerá de un suministro de huevos SPF que podrían no estar disponibles en caso  
35 de una infección más extensa por el virus de la influenza aviar en las aves de corral en Europa. La nueva línea celular, CR-PIX-S está actualmente en plena calificación para la fabricación de vacunas humanas.

Fabricación de un virus de siembra de trabajo (WSV) derivado de CR-PIX-S

40 Para el procedimiento de desarrollo se debe fabricar un nuevo virus de siembra de trabajo basado en la Provisión de partida de siembra maestra/Solución de partida de siembra de trabajo (MCS/WCS) CR-S-PIX. El esquema de pases de esa siembra de trabajo debe permitir la fabricación a gran escala. Para obtener la cantidad necesaria de WSV se debe implementar un pase intermedio entre MSV y WSV. El esquema de pases debe reflejar el procedimiento de fabricación posterior y corresponder a los ciclos de replicación necesarios para preparar suficiente virus de siembra.

Número de pases:	MSV = 1 pase
	WSV = 3 pases
	Producto final = 4 pases

Desarrollo del procedimiento - Fabricación aguas arriba.

45 Para la propagación de MVA-NP+M1 en células CEF o CR-PIX-S se deben utilizar diferentes tecnologías de cultivo. En IDT la vacuna se fabrica primero en CEF con tecnología de botellas rodadoras. La nueva tecnología celular utilizando MVA-NP+M1 se basa en el cultivo en suspensión. La siguiente tabla resume los problemas:

ES 2 624 546 T3

Parámetro	Tecnología rodadora con CEF	Tecnología de suspensión utilizando CR-PIX-S	Observaciones
Datos disponibles	Los parámetros del procedimiento son conocidos	Sólo se conocen parámetros básicos para el crecimiento celular.	La replicación del virus en CR-PIX-S se debe desarrollar y optimizar
Medio de cultivo celular	Crecimiento celular en medio libre de suero	Crecimiento celular en medio libre de suero	El medio de cultivo celular para el crecimiento celular y la replicación del virus en CR-PIX-S puede ser optimizado
Densidad celular de siembra diana	1 - 2 x 10 <sup>6</sup> células/ml	2 - 6 x 10 <sup>5</sup> células/ml	Se debe optimizar para CR-PIX-S
Densidad celular objetivo en la infección	2 - 5 x 10 <sup>6</sup> células/ml	4 - 6 x 10 <sup>6</sup> células/ml	Se debe optimizar para CR-PIX-S
MOI diana	0,01 - 0,1	0,01 - 0,1	Se debe optimizar para CR-PIX-S
Tiempo de infección (TOI) diana	24h después de la siembra celular	24 - 48 h después de la siembra celular	Se debe optimizar para CR-PIX-S
Tiempo de cosecha (TOH) diana	42 - 48 h después de la infección	42 - 48 h después de la infección	Se debe optimizar para CR-PIX-S
Tamaño final del lote de la cosecha del virus para el desarrollo del procedimiento	20 l - 50 l	20 l - 50 l	Está previsto un aumento a escala en la dimensión de 20 l - 50 l.
Cosecha de virus diana por célula	10 - 40 ufp/célula	Al menos 10 - 40 ufp/célula	El posible rendimiento viral por célula en cultivo en suspensión es TBC.

## ES 2 624 546 T3

Evaluación de ambas tecnologías:

Parámetro	Tecnología rodadora (RB)	Tecnología de suspensión CR-PIX-S	Observaciones
Etapas del procedimiento	Preparación de células Siembra de células Intercambio de medio Inoculación de virus Adición de medio	Preparación de células Siembra de células Inoculación de virus Adición de medio Cosecha de virus	Las etapas del procedimiento para las células en suspensión se pueden diseñar asépticamente en sistemas cerrados.
	Cosecha de virus		
Escala	baja	alta	El procedimiento de suspensión no está limitado en términos de escalabilidad
Rendimiento por célula	alto	alto	
Costes materiales	altos	bajos	Los costes para el medio de cultivo de células RB son 5 x superiores. Los costes para RB son 2 x más altos
Duración del procedimiento	72 h	96 h	La duración del procedimiento de suspensión es tbc.
Costes totales del procedimiento	altos	bajos	RB es en términos de duración, medio
			Costes y costes laborales más caros.

5 La evaluación resumida de los dos procedimientos indica que el procedimiento de suspensión es más escalable y tiene costes de funcionamiento más bajos. Sin embargo, la tecnología de suspensión incurre en mayores costes de inversión inicial.

Fabricación aguas abajo

10 La tecnología existente de botella rodadora se basa en etapas de centrifugación para la purificación del producto. Esta tecnología de fabricación es sólo modestamente escalable y tiene varias desventajas en términos de reproducibilidad y diseño aséptico del procedimiento. La tecnología más avanzada se basa en una tecnología FFT combinada que incluye la eliminación de las impurezas de las células anfitrionas.

La siguiente tabla resume las diferentes tecnologías:

Parámetro	Tecnología de centrifugación (TC)	Tecnología FFT (FFT)	Observaciones
Datos disponibles	Los parámetros del procedimiento son conocidos	Se necesita el desarrollo de cosechas de virus derivados de CR-PIX-S y la optimización.	
Duración del procedimiento de fabricación	Al menos 72 h Dependiente de la escala	No más de 48 h	El menor tiempo de procesamiento es una ventaja para el procedimiento de TFF para la tecnología CR-PIX-S.

Evaluación de ambas tecnologías:

Parámetro	Tecnología de centrifugación (TC)	Tecnología FFT (FFT)	Observaciones
Escalabilidad	ninguna	sí	La evaluación se revisa para la purificación de MVA-NP-M1.
Procedimiento aséptico	limitado	sí	
Reproducibilidad	baja	alta	
Aceptación reglamentaria de los estudios de fase III	ninguna	sí	

Producción de virus de la influenza para estudios de sensibilización

5 Retroscreen Virology Limited tiene existencias de virus de influenza BPF adecuadas para estudios de sensibilización en seres humanos. El virus utilizado para la sensibilización es del subtipo H3N2, es sensible al oseltamivir y ya se ha administrado de forma segura a 200 personas. Se necesitará más virus para los estudios de sensibilización descritos anteriormente, y éste se producirá utilizando el lote BPF existente como solución de partida de siembra, en una planta de fabricación de BPF poseída y administrada por la Universidad de Oxford. Los huevos embrionados SPF serán adquiridos de un proveedor reconocido (Charles River) e inoculados con el virus. Después de la incubación 10 durante varios días, el contenido de los huevos se eliminará, se centrifugará para eliminar el material sólido y se sellará en viales estériles. Un huevo producirá hasta 20 viales de virus. Se producirán doscientos viales de virus para la sensibilización, además un extra para permitir la prueba de control de calidad de la preparación. Ésta incluirá la titulación en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), pruebas de esterilidad y detección de virus adventicios. Para el uso en estudios de sensibilización, el virus se diluirá en solución salina (una vez que se conozca el título, la 15 cantidad de dilución requerida se puede determinar exactamente pero es probable que sea del orden de 1 en 100) y se aplicará gota a gota en la nariz de los voluntarios.

Estudios preclínicos en ratones y primates no humanos

Estudios de inmunogenicidad de Adenovirus y MVA, incluyendo estudios de sensibilización, en ratones.

- 20 ● Examinar la inducción de inmunidad duradera por los vectores de MVA y Ad (AdCh-NP+M1) que expresan NP+M1 individualmente y en los regímenes de inmunización de inducción-refuerzo de AdCh-NP+M1/MVA-NP+M1
- Examinar la inducción de inmunidad protectora duradera en ratones no expuestos previamente por vectores de MVA y Ad que expresan NP+M1 después de la inmunización de dosis única y en el régimen de inmunización de inducción-refuerzo AdCh-NP+M1/MVA y desarrollar el control basado en la PCR
- 25 ● Someter a ensayo las vacunas en ratones que han sido previamente expuestos a una cepa de influenza heterosubtípica, para evaluar la capacidad de las vacunas para restablecer la inmunidad protectora en los ratones previamente expuestos.
- Examinar la inducción de protección de subtipo cruzado por estas vacunas contra una cepa de influenza altamente patógena.
- 30 ● Optimizar el suministro de la vacuna a través de parches transdérmicos

Es bien conocida la capacidad de las vacunas de adenovirus de replicación deficiente y MVA que expresan muchos antígenos diferentes para inducir respuestas de células T frente a los antígenos codificados, y hay muchos ejemplos en la bibliografía de regímenes de inducción-refuerzo utilizando estos vectores de vacunas virales en ratones, así como en primates no humanos y humanos. Esta parte del estudio permitirá a los autores de la presente invención 35 evaluar múltiples regímenes de vacunación en ratones, examinar la duración de la inmunidad protectora, someter a ensayo la inmunidad heterosubtípica, identificar correlaciones de inmunidad protectora en ratones y llevar a cabo una evaluación del potencial de la utilización de parches de microagujas para el suministro transdérmico de vacunas vectorizadas virales.

Los virus de la influenza no son patógenos naturales de los ratones, sin embargo, una infección localizada en el tracto respiratorio se observa fácilmente en el plazo de 24 horas desde la infección murina. La mayor parte del trabajo en modelos murinos hasta la fecha ha utilizado experimentos de inducción y sensibilización utilizando dos 40 subtipos de influenza A; A/PR8/34 (PR8, H1N1) y A/HKx31 (HKx31, H3N2) en ratones C57/BL6J o BALB/c. HKx31

es relativamente avirulenta y es un redistribuidor de laboratorio de PR8 y A/HK/168 que expresa HA y NA de A/HK/168 y los seis genes internos de PR8 más virulento. Este virus redistribuido no puede, por lo tanto, ser neutralizado por los anticuerpos contra la HA y la NA de PR8 (H1N1) y la protección cruzada está mediada por inmunidad a los antígenos internos. El modelo de sensibilización respiratorio se caracteriza por una neumonía aguda, transitoria y localizada, con aclaramiento del virus en torno al día 10 después de la infección. La viremia está localizada en el sistema respiratorio y no hay replicación viral en otros tejidos (Doherty y Christensen 2000). Los ratones infectados con PR8 y sensibilizados intranasalmente un mes después con HKx31 aclaran el virus 1-2 días antes que los ratones no sensibilizados previamente y demuestran sólo una pérdida de peso transitoria. El modelo de sensibilización respiratoria con influenza de ratón, utilizando infecciones heterosubtípicas primarias y secundarias, ha sido ampliamente utilizado para comprender las características de las células T CD8<sup>+</sup> efectoras y de memoria (Flynn, Riberdy et al., 1999, Doherty y Christensen 2000, Kedzierska, La Gruta et al., 2006). La población de células T CD8<sup>+</sup> de memoria, inducida por infección primaria, se contrae a lo largo de 3 semanas después de la infección primaria hasta 10% de su nivel máximo (Flynn, Riberdy et al., 1999).

Esta población de memoria es muy estable y se conserva indefinidamente, aunque a muy bajas frecuencias en el pulmón, el tracto respiratorio (medido en el lavado broncoalveolar [BAL]) y el tejido linfóide, con niveles más altos que no se han contraído en el mismo grado en el bazo (Hogan, Usherwood et al., 2001). La presencia de la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria generada por infección primaria por virus o por vacunación puede mediar la recuperación de HKx31 (Flynn, Riberdy et al., 1999), o la protección limitada contra la infección por H7N7 (Christensen, Doherty et al., 2000) cuando esta sensibilización ocurre un mes después de la infección primaria. Aunque la población CD8<sup>+</sup> de memoria, generada por una infección viral primaria, se mantiene durante largos períodos de tiempo, la eficacia frente a la sensibilización heterosubtípica disminuye con el tiempo; ratones inmunes sensibilizados 20 semanas después de la infección primaria muestran títulos virales similares en el pulmón a ratones desafiados no sensibilizados previamente (Liang, Mozdzanowska et al., 1994). La exposición secundaria al virus da como resultado la proliferación clonal masiva y la distribución de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria a los tejidos linfoides y no linfoides, incluyendo el pulmón, el hígado y la médula ósea (Flynn, Riberdy et al., 1999; Kedzierska, La Gruta et al., 2006).

La fuerza de la respuesta de las células T de memoria y su capacidad para controlar y aclarar una sensibilización secundaria pueden verse afectadas por la elección de la ruta y la dosis del virus primario (Liang, Mozdzanowska et al., 1994; Flynn, Riberdy et al. 1999). Este estudio determinará, en un modelo murino, si las respuestas de células T suficientemente fuertes y duraderas son inducidas por vacunación con MVA y adenovirus de simio que expresan NP y M1, en lugar de por infección, que protegerán de manera cruzada contra los subtipos estacionales y virulentos del virus de la influenza, y si la inmunidad protectora puede ser inducida por dosis repetidas de la misma vacuna (refuerzo homólogo) o requiere una inmunización de inducción-refuerzo heteróloga para conseguir inmunidad protectora. Esto es relevante para el desarrollo clínico de las vacunas para su uso en individuos sin sensibilización previa por influenza.

Examinar la inducción de la inmunidad duradera por vectores MVA y de Ad que expresan NP+M1 en dosis única y en regímenes de inmunización de inducción-refuerzo AdCh-NP+M1/MVA-NP+M1

Los estudios iniciales establecerán la inmunogenicidad de una única inmunización con las vacunas AdCh-NP+M1 y MVA-NP+M1. Los autores de la presente invención definirán el régimen de refuerzo de adenovirus homólogo más potente, así como el examen del régimen de vacunas de inducción-refuerzo heterólogo de los cuatro regímenes de vacuna heterólogos en ratones C57/BL6J no sensibilizados previamente utilizando el primer adenovirus de chimpancé para la inducción seguido de un refuerzo de MVA (AdChA/MVA), el segundo adenovirus de chimpancé con MVA (AdChB/MVA); o inducción-refuerzo de adenovirus (AdChA/AdChB y AdChB/AdChA) heterólogo. Los experimentos de inmunogenicidad inicial se centrarán en el examen, por medio de tinción de citoquinas intracelulares y análisis de citometría de flujo, de las respuestas de células T en el bazo y el pulmón a los antígenos NP y M1 en ratones vacunados con las vacunas individuales y con estrategias de inducción-refuerzo. Los autores de la presente invención han encontrado previamente que las vacunas basadas en adenovirus pueden inducir respuestas a epítomos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> adicionales que no se detectan después de la inmunización por vacunas basadas en poxvirus. Los autores de la presente invención examinarán esto mediante la estimulación de las células del bazo *in vitro*, a partir de ratones inmunizados con vacunas simples o de inducción/refuerzo, con reservas de péptidos solapantes de los antígenos NP y M1 completos y elucidación de la amplitud y dominancia de la respuesta inmunitaria. La magnitud y cinética de las células T efectoras y de memoria central inducida por la vacunación se evaluará por citometría de flujo utilizando marcadores fenotípicos de uso común, por ejemplo, CD27, CD43, CD62L, CCR7, CD127 e IL-2.

Examinar la inducción de la inmunidad protectora duradera por vectores de MVA y Ad que expresan NP+M1 en dosis única y regímenes de inmunización de inducción-refuerzo AdCh-NP+M1/MVA-NP+M1 y desarrollar un control basado en la PCR

La inducción de inmunidad protectora por las vacunas vectorizadas virales individuales y por regímenes de inducción-refuerzo se evaluará en ratones no sensibilizados previamente. Los autores de la presente invención compararán la protección inducida por estas vacunas con el modelo de sensibilización con virus de la influenza heterosubtípico bien caracterizado (Doherty y Christensen 2000), utilizando la cepa A/HKx31 (HKx31, H3N2) para

infectar ratones. Se realizarán estudios de sensibilización rigurosos utilizando una inoculación intranasal de una dosis alta ( $2 \times 10^6$  DICT<sub>50</sub>/ratón) del virus de la influenza, cepa A/PR8/34 (PR8, H1N1) un mes después de la vacunación o después de la infección con una infección heterosubtípica primaria usando la cepa A/HKx31 (HKx31, H3N2).

- 5 Los autores de la presente invención examinarán la durabilidad de la protección llevando a cabo la sensibilización 10-15 semanas después de la vacunación o la infección post primaria. La protección contra la sensibilización se controlará midiendo los títulos de virus en el pulmón en la fase aguda después de la sensibilización (días 1-14). Los autores de la presente invención también examinarán la expansión y el fenotipo de las poblaciones de células T después de la sensibilización y su re-distribución en BAL y pulmón. Se tomarán muestras de los bazo, los ganglios linfáticos mediastínicos y el BAL al mismo tiempo que se cosechan los pulmones para los análisis de titulación del virus después de la sensibilización. Los autores de la presente invención investigarán si la vacunación da como resultado una aparición más rápida de células T específicas del antígeno (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) en el BAL y los ganglios linfáticos mediastínicos en comparación con la infección viral primaria, que generalmente infiltran el pulmón alrededor de los días 5-7 días después de la infección intranasal por influenza (Flynn, Riberdy et al., 1999). Los títulos de virus pulmonar, de tejidos recolectados en los días 1-12 se utilizarán para medir el aclaramiento de virus en ratones infectados. En algunos experimentos, las secciones de tejido pulmonar de ratones inmunizados sensibilizados serán examinadas histológicamente para detectar cualquier signo de inmunopatología, un riesgo teórico de las respuestas de células T CD8<sup>+</sup> muy potentes al virus de la influenza.

- La PCR cuantitativa en tiempo real de genomas virales se establecerá como un método alternativo a los métodos de titulación de virus tradicionales en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) como una medida de la infección por virus. Los experimentos iniciales normalizarán estos métodos, de manera similar a las publicaciones anteriores en el sistema modelo de sensibilización rigurosa (Atmar, Baxter et al., 1996). Los autores de la presente invención han demostrado previamente que un método de PCR cuantitativa para el control de la infección de malaria es altamente sensible y puede traducirse a grandes estudios clínicos en el campo (Andrews, Andersen et al., 2005). Por lo tanto esta tarea a) identificará los regímenes de vacunas que induzcan una protección duradera en ratones no sensibilizados previamente frente a una exposición rigurosa con subtipos de virus de influenza que se usan comúnmente como modelo de infección en seres humanos b) establecen la cinética de la infección y el aclaramiento del virus en ratones vacunados, no sensibilizados previamente y expuestos previamente, c) identificar las correlaciones de la protección inducida por la vacuna y d) verificar y normalizar un método rápido y robusto de control de la infección y el aclaramiento del virus que puede trasladarse a otras sensibilizaciones por influenza descritas en la presente memoria.

- En los experimentos de sensibilización inicial se evaluará la desviación típica y el nivel de significación y se realizarán cálculos de potencia para identificar el tamaño de muestra requerido para detectar una eficacia de la vacuna de 80% en comparación con los ratones no vacunados de control. Los autores de la presente invención procurarán minimizar el número de animales utilizados mientras se utilizan números adecuados para obtener datos estadísticamente significativos, maximizando la cantidad de datos útiles de cada animal. Por lo tanto, este estudio de inmunogenicidad y sensibilización debe aportar valiosos conocimientos sobre la capacidad de estas vacunas basadas en MVA y adenovirus para inducir fenotipos inmunitarios específicos y sobre cómo los subconjuntos de células T inducidas por la vacuna contribuyen a prevenir o aclarar una infección del tracto respiratorio.

- 40 Someter a ensayo las vacunas en ratones que han sido previamente expuestos a una cepa de influenza heterosubtípica, para evaluar la capacidad de las vacunas para restablecer la inmunidad protectora en ratones previamente expuestos.

- La mayor parte de la inmunogenicidad de la vacuna de influenza preclínica y los estudios de sensibilización se evalúan en ratones no sensibilizados previamente que pueden no reflejar con precisión la situación clínica de los adultos inmunizantes que poseen respuestas de células T de memoria a la influenza. Los autores de la presente invención van a examinar estos problemas y comparar sus resultados con los generados por las pruebas clínicas descritas en esta solicitud, con el objetivo de optimizar un modelo de ratón adecuado para someter a ensayo la capacidad de las vacunas para reforzar las respuestas de células T adquiridas por la exposición natural. Se establecerá un modelo de preexposición en la tarea 2. Los ratones se infectarán intranasalmente con una dosis baja de la cepa HKx31 de influenza A como modelo de la preexposición humana natural. Las respuestas de células T en el bazo, los ganglios linfáticos mediastínicos y los pulmones se evaluarán a corto (10 días) y largo (8 y 15-20 semanas) plazo después de la infección para establecer una respuesta inmunitaria basal después de la infección primaria. Los ratones inmunes a HKx31 serán sensibilizados mucosalmente con una dosis alta de PR8 a las 8, 15 y 20 semanas para establecer cuándo se pierde la protección. Esto establecerá la longevidad de la protección contra la sensibilización heterosubtípica; de acuerdo con los hallazgos publicados, la protección contra la sensibilización en algunos sistemas modelo se pierde aproximadamente 20 semanas después de la infección primaria (Liang, Mozdanowska et al., 1994). En esta tarea, los ratones expuestos previamente serán vacunados con las vacunas individuales y con el régimen de inducción-refuerzo más inmunogénico en el momento en que la protección haya disminuido.

- 60 Las respuestas de células T efectoras y de memoria se examinarán 2 y 8 semanas después de la inmunización de la manera descrita para los ratones no sensibilizados previamente. También se analizarán la magnitud y el fenotipo de



las células T en tejido de pulmón y BAL. En comparación con los ratones no sensibilizados previamente, se espera que la magnitud de la respuesta en todos los tejidos sea mayor en los ratones previamente expuestos y las respuestas deben ser detectadas en el tejido pulmonar y BAL. Los ratones vacunados previamente expuestos y los ratones no vacunados previamente expuestos se someterán a una sensibilización rigurosa con la cepa PR8 de influenza A a las 8 o 20 semanas de la inmunización para identificar la eficacia protectora y la durabilidad de estos regímenes de vacuna. Finalmente, los autores de la presente invención correlacionarán el fenotipo de las células T que responden con su distribución linfocítica o no linfocítica con la protección contra la sensibilización heterosubtipica en animales vacunados previamente expuestos y no sensibilizados previamente para definir una correlación de la protección dentro del compartimento de células T. El resultado de este estudio demostrará qué vacunas pueden inducir una inmunidad protectora, duradera en un entorno de preexposición.

Examinar la inducción de la protección de subtipo cruzado por estas vacunas contra una cepa de influenza altamente patógena.

Una vacuna de subtipo cruzado altamente eficaz sería una poderosa herramienta para combatir una epidemia o pandemia de influenza. En este estudio, los autores de la presente invención examinarán la capacidad de las vacunas basadas en MVA-NP+M1 y AdCh-NP+M1 para proteger a los ratones contra una sensibilización altamente virulenta con influenza A. Los virus de influenza equina muestran una alta virulencia en los ratones, comparable a la que resulta de la infección por la influenza aviar (H5N1) (Epstein, Kong et al., 2005), sin embargo, los virus de la influenza equina pueden ser manejados en una instalación de bioseguridad de nivel 2, en comparación con la bioseguridad de nivel 3+ para la influenza aviar (Christensen, Doherty et al., 2000, Epstein, Kong et al., 2005). Por lo tanto, los autores de la presente invención planean determinar si la vacuna más prometedora, que demuestra la mayor eficacia en animales no sensibilizados previamente y expuestos previamente, también puede inducir inmunidad protectora contra la influenza equina altamente virulenta. La morbilidad y la mortalidad se utilizarán como criterios de valoración en un estudio inicial. En un estudio de seguimiento, se examinará el control de la replicación del virus y la eliminación del virus en ratones inmunizados con el régimen de vacuna más protector, identificado en el experimento inicial.

Suministrar la vacuna a través de parches transdérmicos

Las vacunas vectorizadas virales que se van a utilizar en este estudio se administran por inyección intradérmica o intramuscular. Sin embargo, los autores de la presente invención también evaluarán el uso de parches transdérmicos para suministrar estas vacunas. Este método de suministro tiene el potencial de simplificar en gran medida la administración de la vacuna. Se prevé que en última instancia los parches previamente preparados se podrían fabricar con la vacuna cargada sobre los parches. Para su uso se aplicarán a continuación a la piel del vacunado, haciéndolos adecuados para su uso en niños o en zonas donde hay escasez de profesionales sanitarios capaces de administrar inyecciones. Se ha demostrado que el suministro transdérmico de plásmidos de ADN es posible utilizando parches de microagujas diseñados a medida. Estas matrices de microagujas se fabrican a partir de silicio o polímero y tienen típicamente de 90-290  $\mu\text{m}$  de longitud; suficiente para penetrar en el estrato córneo impermeable, la capa externa de la piel, sin ser demasiado profundas para penetrar en los receptores del dolor en la dermis. Cuando se aplica el parche de microagujas a la piel, se crean micro-canales que permiten que los fármacos y las vacunas de plásmido de ADN sorteen el estrato córneo. Se ha demostrado que el antígeno codificado por el ADN suministrado transdérmicamente se expresa en la piel humana *ex vivo* (Birchall, Coulman et al., 2005). En los estudios preliminares que han realizado los autores de la presente invención, han realizado observaciones *in vivo* similares utilizando vectores de virus, lo que demuestra que el suministro transdérmico tiene un gran potencial como una estrategia de vacunación simple y eficaz. Se sabe que tanto las vacunas de adenovirus como vectorizadas con MVA son altamente inmunogénicas cuando se suministran por vía intradérmica, haciéndolas particularmente adecuadas para este tipo de suministro. Los estudios iniciales compararán las respuestas inmunitarias en ratones inmunizados por parche transdérmico o inmunización intradérmica, utilizando ambos tipos de vectores de vacunas virales. A continuación se podría llevar a cabo un estudio clínico para replicar los hallazgos en seres humanos.

Estudios de inmunogenicidad de las vacunas de adenovirus reforzadas con el adenovirus heterólogo o con MVA en primates no humanos

Los estudios de inmunogenicidad se realizarán en macacos Rhesus. Los autores de la presente invención seguirán un enfoque de dos etapas. Esto permitirá reducir al mínimo el número de animales experimentales. Además, los autores de la presente invención tendrán la posibilidad de comparar 2 vectores de Ad diferentes y 3 diferentes estrategias de inducción-refuerzo heterólogos con sólo 5 grupos de 3 macacos.

En la **Etapas 1** los autores de la presente invención realizarán un estudio de respuesta de dos dosis con cada uno de los dos diferentes vectores AdCh-NP+M1 (AdChA-NP+M1; AdChB-NP+M1). Todos los experimentos se llevarán a cabo en animales sanos que serán previamente evaluados para determinar la presencia de inmunidad pre-existente contra los vectores de Ad. El programa de inmunización se basará en dos inyecciones intramusculares en la semana 0 y en 4 de cada uno de los dos vectores, administrados a dosis de  $10^9$  y  $10^{10}$  pp de cada vector:

Se inscribirán 12 macacos Rhesus y se dividirán en 4 grupos de 3 animales:

- El Grupo 1 incluirá 3 animales que recibirán AdChA-NP+M1a  $10^9$  partículas virales totales/dosis en la semana 0 y 4

- El Grupo 2 incluirá 3 animales que recibirán AdChA-NP+M1 a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 0 y 4

5 - El Grupo 3 incluirá 3 animales que recibirán AdChB-NP+M1 a  $10^9$  partículas virales totales/dosis en la semana 0 y 4

- El Grupo 4 incluirá 3 animales que recibirán AdChB-NP+M1 a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 0 y 4

10 El seguimiento de la inmunogenicidad se realizará a las 2, 4, 6, 8 semanas de la primera vacunación. Estos datos dirán cuál es el vector AdCh-NP+M1 más potente.

En la **Etapla 2**, los autores de la presente invención utilizarán el vector más potente para el experimento con MVA, a la dosis más alta:

- El Grupo 5 incluirá 3 animales que recibirán el AdCh-NP+M1 más potente a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en las semanas 0 y 4 y MVA a  $2 \times 10^8$  ufp/dosis en la semana 24

15 El seguimiento de la inmunogenicidad se realizará en la semana 0, 4, 8, 12, 18, 24, 27, 32, 40 y 48 después de la primera vacunación. El ensayo de inmunogenicidad más importante será a las 2, 4, 6, 8, 27 semanas. La respuesta efectora pico se produce una semana después del refuerzo de MVA, por lo tanto, el ensayo se realizará a las 27 y no a las 28 semanas en este experimento.

20 Paralelamente, los autores de la presente invención reforzarán los grupos inducidos en la Etapa 1 con el AdCh-NP+M1 heterólogo a la dosis más alta en la semana 24:

- Los 3 animales del Grupo 1 - que recibieron AdChA-NP+M1 a  $10^9$  partículas virales totales/dosis en las semanas 0 y 4 - recibirán AdChB-NP+M1 a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 24

- Los 3 animales del Grupo 2 - que recibieron AdChA-NP+M1 a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en las semanas 0 y 4 - recibirán AdChB-NP+M1 a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 24

25 - Los 3 animales del Grupo 3 - que recibieron AdChB-NP+M1 a  $10^9$  partículas virales totales/dosis en la semana 0 y 4 - recibirán AdChA-NP+M1a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 24

- Los 3 animales del Grupo 4 - que recibieron AdChB-NP+M1 a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 0 y 4 - recibirán AdChA-NP+M1a  $10^{10}$  partículas virales totales/dosis en la semana 24

30 El seguimiento de la inmunogenicidad se realizará en las semanas 12, 18, 24, 26, 28, 32, 40 y 48 después de la primera vacunación. En este caso, el ensayo de inmunogenicidad más importante será en las semanas 24, 26, 28.

35 Se recogerán muestras de sangre de los animales antes de la vacunación para aislar suficientes PBMC y sueros con el fin de utilizarlos como muestras de referencia durante el curso del estudio para que las respuestas a la vacuna puedan evaluarse mejor en comparación con una referencia. También se realizará un escrutinio de vectores virales (serología de adenovirus) antes de la vacunación. Los ensayos incluirán los siguientes análisis: ELISA, ELISpot IFN $\gamma$ , Tinción Intracelular de Citoquinas (ICS) IFN $\gamma$ , Tetrámero de Clase I del MHC, proliferación de células T.

Estudios de inmunopatología tras la exposición al virus de la influenza en macacos rhesus

40 El objetivo de esta parte del estudio es examinar la seguridad de la presencia de una fuerte respuesta de células T a los antígenos de la influenza en el momento de la infección con influenza. La evaluación inmunopatológica se realizará en macacos rhesus. Los autores de la presente invención compararán la seguridad de las vacunas, el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares (ICS), la expulsión y liberación virales y la patología en los tejidos respiratorios en tres grupos de animales. Todos los experimentos se llevarán a cabo en animales sanos previamente seleccionados para determinar la ausencia de respuestas inmunitarias a los vectores virales que se van a utilizar (AdCh, así como MVA). Se evaluarán dos regímenes de vacunación, así como un grupo de control no vacunado.

45 El **Grupo 1** incluirá 6 animales que recibirán dos inyecciones intramusculares de AdCh-NP+M1 en las semanas 0 y 4 con una dosis inmunogénica óptima como se establece en los estudios de inmunogenicidad. Estos animales serán reforzados con MVA-NP+M1 en la semana 24 (régimen altamente inmunogénico).

50 El **Grupo 2** incluirá 6 animales que recibirán dos inyecciones intramusculares de AdCh-NP+M1 en las semanas 20 y 24 con una dosis inmunogénica óptima como se establece en los estudios de inmunogenicidad (régimen moderadamente inmunogénico). El **Grupo 3** incluirá 6 animales que no recibirán inyecciones (ninguna respuesta a los antígenos de la gripe).

- 5 La inmunogenicidad se analizará en células estimuladas *ex vivo* por citoquinas intracelulares y tinción con marcador de superficie. Se incluirán los siguientes: CD3, CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , perforina y granzima. Las evaluaciones de inmunología para los grupos 1 y 3 se realizarán en muestras tomadas en las semanas 0, 2, 4, 6, 20, 24, 26 y cuando se sacrifiquen. Para el grupo 2 se realizarán evaluaciones de inmunología en muestras obtenidas en las semanas 20, 24, 26 y cuando se sacrifiquen.
- 10 La seguridad se evaluará en cada inmunización mediante la inspección de los sitios de inyección (eritema y edema), así como la química clínica (riñón, hígado, proteínas y electrolitos) y la hematología (recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos y diferenciación). Las muestras para la química clínica y la hematología se tomarán en el momento de la vacunación y 1 día después de la vacunación, la inspección de los sitios de inyección también se llevará a cabo en estos puntos temporales.
- Todos los animales serán sensibilizados por instilación intratraqueal de  $10^7$  DICT del virus de sensibilización en la semana 26.
- Los hisopos nasales y faríngeos se recogerán los días 2, 4 y 10 después de la sensibilización. Los hisopos se analizarán para determinar el título de virus utilizando métodos virológicos convencionales.
- 15 Todos los animales serán sacrificados el día 10 después de la infección, se llevará a cabo una necropsia completa con especial atención a la patología respiratoria. Las láminas histológicas serán preparadas a partir de una variedad de tejidos respiratorios (nasales, faríngeos, así como varias muestras de los pulmones) y evaluadas por un patólogo veterinario entrenado.
- Estudios clínicos con vacunas AdCh y MVA
- 20 Aumento a escala de la dosis de la fase I con AdChNP+M1
- Esto examinará la seguridad e inmunogenicidad de AdChNP+M1 en seres humanos y servirá también para determinar la dosis que se vaya a utilizar en el estudio de Fase IIa descrito más adelante.
- 25 Este estudio seguirá el mismo enfoque que el planificado para un estudio de aumento de la dosis en la Fase I con AdCh63 que expresa un antígeno de malaria. Ambos estudios tendrán lugar en el Centre for Clinical Vaccinology and Tropical Medicine, Oxford, donde se han llevado a cabo de manera satisfactoria muchos otros estudios de Fase I y Fase IIa. El estudio de la vacuna contra la malaria será un estudio de Primeros Ensayos en Ser Humano ("First Time in Man") para una vacuna vectorizada con adenovirus de simio de replicación defectuosa. En la actualidad se está buscando la aprobación reguladora y ética para este estudio (a partir de abril de 2007) aunque después de las discusiones preliminares con el MHRA se espera que el permiso sea concedido. Se espera que el estudio tenga lugar durante el segundo semestre de 2007. Si se requieren más información o medidas de seguridad, esta información se tendrá en cuenta al solicitar permiso para el estudio de AdChNP+M1, y los datos de seguridad del estudio de la vacuna contra la malaria se utilizarán para apoyar el estudio de la vacuna contra la gripe.
- 30 Grupos de Estudio
- 35 Este será un estudio abierto de aumento de dosis de Fase 1 en voluntarios sanos. Habrá 4 grupos de estudio, cada uno con 8 voluntarios. El reclutamiento de grupos será secuencial.
- Observaciones
- Las observaciones que se documentarán son el pulso, la presión arterial y la temperatura.
- Análisis de sangre
- Se extraerá sangre para las siguientes pruebas de laboratorio:
- 40 1. En Oxford Radcliffe Hospitals NHS Trust Laboratories, utilizando los procedimientos convencionales del NHS:
- Hematología; Recuento de sangre completa
  - Bioquímica; Sodio, Potasio, Urea, Creatinina, Albúmina, Pruebas de función hepática, Glucosa
- 45
- Serología diagnóstica; Anticuerpos de adenovirus, HBsAg, anticuerpos de VHC, anticuerpos contra el VIH (se proporcionará asesoramiento antes de la prueba de sangre para estos virus transmitidos por la sangre)
  - Inmunología; Tipificación de antígeno leucocitario humano (HLA)
2. En los laboratorios de investigación de la Universidad de Oxford:
- Inmunología Exploratoria; Se realizarán análisis Elispot *ex vivo* para determinar el interferón gamma.

Se pueden llevar a cabo, a discreción de los investigadores, otros análisis inmunológicos exploratorios, incluyendo análisis Elispot para interleuquina-2, análisis de citometría de flujo, análisis de anticuerpos y factor de necrosis tumoral alfa. Estos pueden incluir estudios de expresión génica.

#### Análisis de orina

- 5 La orina se someterá a ensayo para el escrutinio de proteínas y glucosa. Para mujeres voluntarias solamente, se someterá a ensayo la orina para determinar gonadotropina coriónica beta-humana (HCG) en el escrutinio e inmediatamente antes de cada vacunación.

#### Vacunas

- 10 Antes de cada vacunación, se revisará la elegibilidad continuada del voluntario. Se administrará la vacuna, se cubrirá el sitio de inyección con un apósito estéril y el voluntario permanecerá en el CCV/TM durante media hora, en caso de eventos adversos inmediatos. Las observaciones se tomarán 30 minutos después de la vacunación y se retirará el apósito estéril y se inspeccionará el sitio de la inyección. Se entregará un termómetro oral, cinta métrica y tarjeta de diario a cada voluntario, con instrucciones de uso.

El grupo 1 recibirá una dosis única de  $1 \times 10^8$  pv

- 15 El grupo 2 recibirá una dosis única de  $1 \times 10^9$  pv

El grupo 3 recibirá una dosis única de  $1 \times 10^{10}$  pv

El grupo 4 recibirá una dosis única de  $5 \times 10^{10}$  pv

- 20 Siguiendo las nuevas pautas de MHRA, en cada grupo, el primer voluntario será vacunado 48 horas antes que cualquier otro voluntario para evitar un evento adverso grave previamente insospechado que afecte a múltiples voluntarios. El voluntario será vacunado intradérmicamente y luego observado durante 30 minutos antes del alta. Los autores de la presente invención visitarán a este voluntario a las 48 horas y después, siempre que no haya problemas de seguridad, vacunarán a otros 2 voluntarios de este grupo de dosificación. Estos voluntarios serán visitados después de 48 horas. Si todavía no hay problemas de seguridad, entonces vacunarán a los 5 miembros restantes de la cohorte. Todos los voluntarios recibirán el número de teléfono y de buscapersonas de los investigadores y se les animará a contactar con los investigadores si hay algún problema. Los investigadores estarán disponibles las 24 horas del día.

- 30 La respuesta de células T efectoras y de memoria a los antígenos NP y M1 se determinará utilizando péptidos solapantes en análisis Elispot (tanto ex vivo como en células cultivadas) en la muestra de sangre de escrutinio del voluntario y en una muestra adicional tomada el día de la inmunización. Las visitas de seguimiento tendrán lugar los días 2, 14, 28, 90. Los voluntarios serán evaluados para determinar eventos adversos locales y sistémicos, usando una tarjeta de diario, historia intermedia, examen físico y análisis de sangre en los momentos temporales indicados en el programa de asistencia. También se tomará sangre para análisis de inmunología exploratoria, incluyendo análisis Elispot de IFN- $\gamma$  *ex-vivo* y cultivado, así como citometría de flujo. Se ha logrado un progreso sustancial hacia análisis de calidad BCLP completos para estas respuestas de células T. Para los epítomos seleccionados, se dispone de tetrámeros de tipos de HLA de clase I y éstos se utilizarán para fenotipificar las células T CD8<sup>+</sup> inducidas.
- 35 Los autores de la presente invención evaluarán la reactividad cruzada de subtipos reuniendo péptidos que están completamente conservados entre los subtipos H3N2, H1N1 y H5N1 y elaborando reservas específicas de los subtipos para permitir la cuantificación de reacciones cruzadas entre subtipos.

- 40 La seguridad será evaluada por la frecuencia, incidencia y naturaleza de los eventos adversos y eventos adversos graves que surjan durante el estudio. Después de cada intervalo de dosis se llevará a cabo una revisión de seguridad. Ésta será interna y consistirá en una revisión de todos los efectos adversos en voluntarios antes de proceder al siguiente intervalo de dosificación. Finalmente, se revisarán los datos de seguridad e inmunogenicidad y se elegirá una dosis para el estudio de fase IIa.

- 45 Se describen dos estudios de sensibilización de influenza de Fase IIa, empleando cada uno una única vacunación con MVA-NP+M1 o AdChNP+M1, a la dosis determinada durante los estudios de fase I para cada vacuna.

#### Estudios de sensibilización

- 50 El concepto de infección de voluntarios se inició en la Unidad de Resfriado Común, Salisbury en 1948 (Tyrrell y Fielder 2002). Se alojaron grupos de 20 a 30 voluntarios en edificios con vigilantes separados y se aislaron físicamente tanto del personal como de los otros voluntarios. Se ha establecido una unidad de cuarentena en Londres capaz de infectar hasta 100 voluntarios (Fries, Lambkin et al., 2004).

La eficacia protectora de las vacunas MVA-NP+M1 y AdCh-NP+M1 se someterá a ensayo en un estudio de sensibilización con seres humanos. El análisis de esta prueba debe proporcionar una prueba de principio.

Se preparará un protocolo de pruebas clínicas para todo el estudio, incorporando información de las pruebas de fase

I con las dos vacunas. La aprobación ética y reglamentaria se obtendrá del comité de ética correspondiente (local) y de la agencia nacional de licencias, la Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios. Para cada estudio se reclutarán 30 jóvenes voluntarios sanos. Estos serán seleccionados para asegurar bajos títulos de anticuerpos anti-gripe. A los voluntarios se les administrará una dosis única de la vacuna (dosis determinada durante los estudios de fase I) o de un placebo, y a continuación se sensibilizarán con una dosis infecciosa para seres humanos de 0,50 a 0,75 dos semanas más tarde. Esto producirá síntomas clínicos en aproximadamente 50-75% de los voluntarios. Se controlarán los signos clínicos completos, sistémicos y locales.

Se tomarán muestras de sangre y fluidos orales e hisopos de garganta para determinar la recuperación del virus diariamente (muestras de lavado nasal) y después de la sensibilización (p. ej., 9-10 días). Las muestras de sangre, lavado nasal y fluido oral se utilizarán en los ensayos inmunológicos más relevantes identificados durante los estudios de fase I. Las respuestas de células T y de anticuerpos a todos los antígenos de influenza se medirán en todos los voluntarios, para obtener una mayor comprensión de la respuesta inmunitaria aguda a la infección por gripe.

Se llevará a cabo análisis serológicos (p. ej. HI, SRH, VN, MN, ELISA).

Todos los voluntarios serán tratados con oseltamivir al final de la prueba y serán devueltos a la unidad 2 semanas y 6 meses después para chequeos médicos y se recogerán muestras de sangre, lavado nasal y fluido oral para investigar la respuesta inmunitaria utilizando análisis inmunológicos apropiados.

Los datos clínicos y las muestras inmunológicas de estos estudios se utilizarán para evaluar la eficacia protectora de las nuevas vacunas. Las pruebas clínicas cubrirán la brecha entre los estudios clínicos y preclínicos y permitirán someter a ensayo la prueba de principio en seres humanos. Al analizar los datos obtenidos los autores de la presente invención serán capaces de evaluar la capacidad de una respuesta de células T a NP y M1 para reducir tanto la expulsión y liberación virales como los síntomas de la enfermedad. Estos datos les permitirán evaluar el impacto que las nuevas vacunas podrían tener si fueran ampliamente desplegadas.

Ejemplo 8: Fabricación y ensayo de lotes clínicos

Se ha fabricado un lote clínico. Los ensayos de control de calidad revelan que cumple con las expectativas. Los autores de la presente invención presentan los resultados de los diversos análisis realizados.

En particular, este ejemplo presenta un análisis de identidad y pureza de MVA-NP+M1. MVA-NP+M1 fue fabricado por IDT como se describe en la presente memoria. En este ejemplo, la muestra de ensayo era el lote 010907, (llenado en húmedo) vial 12.

Sección experimental:

Se llevaron a cabo análisis de PCR para determinar la identidad y la pureza del lote clínico fabricado por IDT, (lote 010907) del vial 12 de MVA-NP+M1.

Procedimiento:

Los análisis se realizaron de acuerdo con SOP FM001. Se realizaron tres reacciones de PCR, para detectar NP+M1, o proteína fluorescente roja (RFP), o virus de tipo salvaje, en cinco muestras cada uno.

Muestra	Descripción	Producto de PCR esperado con		
		Peso	RFP	NP+M1
Muestra de ensayo	Muestra de ensayo	-	-	+
MVA tipo salvaje	Control	+	-	-
MVA-Rojo	Control	-	+	-
MVA-NP+M1	Control	-	-	+
Agua destilada estéril	Control	-	-	-

La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos de PCR.

Ejemplo 9: Inmunogenicidad del lote clínico

El lote clínico de MVA-NP+M1 fabricado como se ha indicado anteriormente se examinó utilizando un análisis de inmunogenicidad. Con más detalle, se sometió a ensayo MVA-NP+M1 fabricado por el Lote 010907 de IDT, (llenado en húmedo) vial 12.

Sección experimental:

- 5 Se llevó a cabo un ELISPOT de IFN- $\gamma$  de ratón para determinar la inmunogenicidad del lote clínico fabricado por IDT (lote 010907) del vial 12 de MVA-NP+M1.

Procedimiento:

- 10 Se vacunaron cuatro ratones por vía intradérmica con  $10^7$  ufp de MVA-NP+M1 (llenado en húmedo) producido por el Lote núm. 010907 de IDT. Catorce días más tarde los ratones fueron sacrificados y los bazo cosechados para un análisis IFN- $\gamma$  ELISPOT realizado de acuerdo con SOP FM003.

El fondo se definió como el número de células formadoras de manchas (UFM) por millón de esplenocitos observadas cuando las células fueron estimuladas solamente con 10% de MEM (MEM + 10% FCS + 1% L-Glut + 1% Pen-strep).

Resultados:

- 15 Las células se cultivaron en placas por duplicado para cada ratón y se sometieron a recuento los pocillos que contenían  $5 \times 10^5$  células. Esto se utilizó a continuación para calcular las UFM medias/millón de esplenocitos.

	Medios	Péptido de la gripe	Gripe neta
M1	32	219	187
M2	51	190	139
M3	56	257	201
M4	37	246	209
Promedio	44	222	184
DT	11	30	31

Conclusión:

- 20 El análisis de potencia demostró que el Lote 010907 fabricado por IDT provocaba una respuesta inmunitaria fuerte, con un número medio de células formadoras de manchas por millón de esplenocitos en el análisis ELISPOT mayor de 15, y no más de un ratón que no respondiera de los cuatro sometidos a ensayo. El límite inferior de detección del análisis es de 5 manchas por millón de esplenocitos. Los datos ilustrativos se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 9: Estudios adicionales de inmunogenicidad

Los autores de la presente invención también demuestran respuestas inmunitarias a los epítomos tanto de NP como de M1 en ratones.

- 25 En este ejemplo, se utilizó una dosis única de  $10^6$  ufp. La administración fue intradérmica.

Las respuestas inmunitarias se evaluaron mediante el ELISPOT de bazo a los 14 días:

NP: TYQRTRALV

M1: LYRKLKREI

- 30 Los resultados se muestran en la Figura 7 que ilustra que se generan respuestas inmunitarias a epítomos específicos dentro de las diferentes partes de material compuesto (NP/M1) del inmunógeno de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 10: Estudios clínicos adicionales

El primer voluntario se va a vacunar 24 h antes de continuar con el resto del grupo

Los otros voluntarios vacunados el mismo día pueden ser vacunados a partir del mismo vial (en el grupo 1)

- el número máximo vacunado de un vial es probable que sea 3

Cada grupo probablemente será vacunado durante un período de varias semanas

- debido a las limitaciones de reclutamiento

5 - los autores sugieren un máximo de tres vacunados por día para mayor seguridad

- se encuentran disponibles cuatro becarios de investigación clínica y una enfermera de investigación si se encuentran disponibles varios voluntarios el mismo día

- Se utilizará el registro de delegación

- Se incluyen el ensayo para MVA wt en QC

10 • La preparación de CEF primarios es convencional en la fabricación de la vacuna y el QC completo se incluye en las células, así como el virus.

- Estudio de tox de dos dosis de BPL

- cada dosis es de  $1,5 \times 10^7$  ufp

- el IMP fue bien tolerado

15 - ningún animal mostró reacciones adversas al IMP

- Sólo FCS Norteamericano utilizado en la preparación del virus recombinante

- no se utiliza FCS durante la fabricación BPF

- Los voluntarios no serán evaluados para determinar la infección actual por la gripe A.

Ejemplo 11: Estudio de Fase IIa

20 • Cuando la prueba de fase I demuestra buena seguridad e inmunogenicidad de MVA-NP+M1

- sigue un futuro estudio de vacunación y sensibilización (Fase IIa)

- La dosis para la fase IIa se elige basándose en los resultados de la Fase I

- Los voluntarios van a ser escrutados para determinar anticuerpos contra la gripe de baja patogenicidad,

- controles y vacunados sensibilizados con H3N2

25 - respuestas de Ab y de células T a todos los antígenos de la gripe que se van a controlar en todos los participantes antes y después de la sensibilización

- También se puede llevar a cabo la Fase IIb (infección por exposición natural).

Ejemplo 12: Inmunogenicidad para todos los inmunógenos

30 Se llevaron a cabo experimentos similares a los presentados en los ejemplos precedentes (tales como los Ejemplos 8 y 9) sobre un conjunto completo de péptidos solapantes en ratones.

Identificación de nuevos epítomos de células T inducidos por MVA-NPM1:

35 Los autores de la presente invención han demostrado que la vacuna MVA-NPM1 puede inducir respuestas de células T a epítomos de células T dominantes en NP y M1. Para examinar la amplitud de la respuesta inmunitaria y para examinar si esta vacuna puede inducir respuestas de células T a nuevos epítomos, se inmunizaron ratones hembra C57/BL6 o Balb/c con  $1 \times 10^7$  ufp/ml de MVA - NPM1. La amplitud de la respuesta inmunitaria se evaluó dos semanas después de una única inmunización mediante la reestimulación de las células del bazo con una matriz de reservas de péptidos solapantes (Tobery et al., J. Imm. Methods, 2001, 254, 59-66) en un análisis ELISPOT de IFN- $\gamma$ . Además de los epítomos previamente sometidos a ensayo (véase más arriba) en ratones Balb/c, 12 epítomos en NP y 8 epítomos en M1 fueron reconocidos por las células T de ratones inmunizados con MVA-NPM1. En ratones 40 C57/BL6 las células T respondieron a 4 epítomos en NP y 2 epítomos en M1.

Los resultados de este experimento con matriz demuestran en dos cepas diferentes de ratones que (i) el constructo NPM1 es inmunogénico, (ii) se induce una amplia respuesta de células T y (iii) se induce una respuesta de células T a las proteínas NP y M1. De ese modo se demuestra la efectividad de la invención.

Los datos demuestran que la invención produce una respuesta amplia contra ambos antígenos en dos cepas de ratones.

5 Así, en general, los datos presentados en la presente memoria sobre el producto clínico de la invención demuestran una inmunogenicidad excelente, muestran que la secuencia del inserto está confirmada, demuestran la presencia de antígeno y la ausencia de MVA de tipo salvaje confirmada e ilustran que la vacuna es genéticamente estable.

Diversas modificaciones y variaciones de los aspectos y realizaciones descritos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la presente invención se ha descrito en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención se define en las reivindicaciones.



**Lista de Secuencias**

SEQ ID NO: 1  
 secuencia de aminoácidos de A/Panama/2007/99  
 optimizada para el uso de codones humanos  
 NP seguida de conector (minúsculas - gggpggg) seguido por M1.

5

MASQGTKRSYEQMETDGRQNATEIRASVGKMGIDGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIE  
 KMLSAFD  
 ERRNRYLEEHPGAGKDPKKTGGP  
 IYRRVDGKWMRELVLYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHMMIWHNSLNDDTTYQRTRALVRTG  
 MDPRMCSLM  
 QGSTLPRRSGAAGAAYKIG  
 TMVMELIRMVYKRGINDRNFWRGENGRKTRSAYERMCNILKGFQTAQRAMVDQVRESRNP  
 GNAEIEDLIFL  
 ARSALILRGSVAHKSCLPACVY  
 GPAVSSGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRLLS  
 FIRGTKVS  
 PRGKLSTRGVQIASNENMDNMGS  
 STLELRSGYWAIRTRSGGNTNQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFEKSTVMAAFTGNTEGRTSD  
 MRAEIRMM  
 EGAKPEEVSFRGRGVFELSDEKAT  
 NPIVPSFEMSNEGSYFFGDNAEEYDNggggpgggMSLLTEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVF  
 AGKNTDL  
 EALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLT  
 VPSEGLQRRRFVQNALNGNDPNMMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEIALSYSAGALASCMG  
 LIYNRMGAVT  
 TEVAFGLVCATCEQIADSQHRS  
 HRQMVATTNPLIKHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEIASQARQMVQAMRTVGT  
 HPSSSTGLRDDL  
 LENLQTYQKRMGVQMQRFK

SEQ ID NO: 2  
 secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de A/Panama/2007/99 del SEQ ID NO: 1  
 optimizada para el uso de codones humanos  
 NP seguida de un conector seguido de M1.

10

ES 2 624 546 T3

ATGCCAGCCAGGGCACCAAGCGGAGCTACGAGCAGATGGAAACCGACGG  
CGACCGGCAGAACGCCACCGAG  
ATCCGGGCCAGCGTGGGC  
AAGATGATCGACGGCATCGGCCGTTCTACATCCAGATGTGCACCGAGCTGAAG  
CTGTCCGACTACGAGGGC  
CGGCTGATCCAGAACAGCCT  
GACCATCGAGAAGATGGTGTCTCCGCCTTCGACGAGCGGCGGAACAGATACC  
TGGAAGAGCACCCCAGCGC  
CGGCAAGGACCCCAAGAAA  
ACGGCGGACCCATCTACGGCGGGTGGACGGCAAGTGGATGCGGGAGCTG  
GTGCTGTACGACAAAGAGGAA  
ATCCGGCGGATCTGGCGGCA  
GGCCAACAACGGCGAGGACGCCACAGCCGGCCTGACCCACATGATGATCTG  
GCACAGCAACCTGAACGACAC  
CACCTACCAGCGGACCAGG  
GCCCTCGTGGACCGGCATGGACCCCCGGATGTGCAGCCTGATGCAGGGC  
AGCACACTGCCAGAAGAAGC  
GGAGCTGCCGGAGCCGCCGT  
GAAGGGCATCGGCACCATGGTGTGGAAGTATCCGGATGGTGAAGCGGGGC  
ATCAACGACCGGAATTTTG  
GAGGGGCGAGAACGGCAGAA  
AGACTAGAAGCGCCTACGAGCGGATGTGCAACATCCTGAAGGGCAAGTCCAG  
ACAGCCGCCAGCGGGCCA  
TGGTGGACCAGGTCCGGGAG  
AGCCGGAACCCCGGCAACGCCGAGATCGAGGACCTGATCTTCTGGCCCCGGT  
CCGCCCTGATCCTGCGGGGC  
AGCGTGGCCCACAAGAGCTG  
CCTGCCCGCCTGCGTGTACGGCCCTGCCGTGAGCAGCGGCTACGACTTCGAG  
AAAGAGGGCTACAGCCTGGT  
CGGCATCGACCCCTCAAGCT  
GCTGCAGAACAGCCAGGTGTACAGCCTGATCCGGCCCAACGAGAACCCCGC  
CCACAAGTCCCAGCTGGTCTG  
GATGGCCTGCCACAGCGCC

ES 2 624 546 T3

GCCTTCGAGGATCTGCGGCTGCTGTCCTTCATCCGGGGCACCAAGGTGTCCCC  
AGGGGCAAGCTGTCCACC  
AGAGGCGTGCAGATCGCCAG  
CAACGAGAACATGGACAACATGGGCAGCAGCACCCCTGGAAGTGCAGGAGCGG  
CTACTGGGCCATCCGGACCCG  
GTCCGGCGGCAACACCAAC  
CAGCAGCGGGCCAGCGCCGGACAGATCAGCGTGCAGCCCACCTTCTCCGTG  
CAGCGGAACCTGCCCTTCGAG  
AAGAGCACCGTGATGGCCGC  
CTTACCGGCAACACCGAGGGCCGGACCAGCGACATGCGGGCCGAGATTATC  
CGGATGATGGAAGGCGCAA  
GCCCCGAGGAAGTGAGCTTC  
CGGGGCAGGGCGTGTTCGAGCTGTCCGATGAGAAGGCCACCAACCCCATCG  
TGCCAGCTTCGAGATGAGC  
AACGAGGGCAGCTACTTCTT  
CGGCGACAACGCCGAGGAATACGACAATGGCGGCGGACCAGGCGGCGGAA  
TGAGCCTGCTGACCGAGGTGGA  
GACCTACGTGCTGTCCATC  
GTGCCTAGCGGCCCTCTGAAGGCCGAGATCGCCCAGCGGCTGGAAGATGTGT  
CGCCGGCAAGAACACCGAC  
CTGGAAGCCCTGATGGAATG  
GCTGAAAACCCGGCCCATCCTGAGCCCCCTGACCAAGGGCATCCTGGGCTTC  
GTGTTACCCCTGACCGTGCC  
CAGCGAGCGGGGCCTGCAGC  
GGCGGAGATTCGTGCAGAACGCCCTGAACGGCAACGGCGACCCCAACAACA  
TGGATAAGGCCGTGAAGCTGT  
ACCGGAAGCTGAAGCGGGA  
GATCACCTCCACGGCGCCAAAGAGATCGCCCTGAGCTACAGCGCCGGAGCC  
CTGGCCAGCTGCATGGGCCT  
GATCTACAACCGGATGGGCG  
CCGTGACCACCGAGGTGGCCTTCGGCCTGGTCTGCGCCACCTGCGAGCAGAT  
CGCCGACAGCCAGCACAGAT  
CCCACCGGCAGATGGTGGCC  
ACAACCAACCTCTGATCAAGCACGAGAACCGGATGGTGCTGGCTAGCACCAC  
CGCCAAGGCCATGGAACAG  
ATGGCCGGCAGCAGCGAGC  
AGGCCGCCGAAGCCATGGAATCGCCAGCCAGGCCAGACAGATGGTGCAGG  
CCATGCGGACCGTGGGCACCC  
ACCCAGCAGCTCCACCGG  
CCTGCGGGACGACCTGCTGGAAAACCTGCAGACCTACCAGAAACGGATGGGG  
GTGCAGATGCAGCGGTTCAAGTGA

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Isis Innovación Limited  
 <120> Composiciones y Métodos  
 <130> P2468EP01  
 5 <140> 07255070.0  
 <141> 2007-12-28  
 <160> 6  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 10 <211> 757  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> NP-conector-M1 optimizado  
 15 <400> 1  
 Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met  
 20 25 30  
 Ile Asp Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys  
 35 40 45  
 Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu  
 50 55 60  
 Lys Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Arg Tyr Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile  
 85 90 95  
 Tyr Arg Arg Val Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Val Leu Tyr Asp  
 100 105 110  
 Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp  
 115 120 125  
 Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn  
 130 135 140  
 Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp  
 145 150 155 160

ES 2 624 546 T3

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Ile Gly Thr Met Val Met Glu  
 180 185 190  
 Leu Ile Arg Met Val Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg  
 195 200 205  
 Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn  
 210 215 220  
 Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Val Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu  
 245 250 255  
 Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His  
 260 265 270  
 Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly  
 275 280 285  
 Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe  
 290 295 300  
 Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu  
 305 310 315 320  
 Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala  
 325 330 335  
 Ala Phe Glu Asp Leu Arg Leu Leu Ser Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val  
 340 345 350  
 Ser Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn  
 355 360 365  
 Glu Asn Met Asp Asn Met Gly Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Gly  
 370 375 380  
 Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg  
 385 390 395 400  
 Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg

ES 2 624 546 T3

405					410					415									
Asn	Leu	Pro	Phe 420	Glu	Lys	Ser	Thr	Val 425	Met	Ala	Ala	Phe	Thr 430	Gly	Asn				
Thr	Glu	Gly 435	Arg	Thr	Ser	Asp	Met 440	Arg	Ala	Glu	Ile	Ile 445	Arg	Met	Met				
Glu	Gly 450	Ala	Lys	Pro	Glu	Glu 455	Val	Ser	Phe	Arg	Gly 460	Arg	Gly	Val	Phe				
Glu 465	Leu	Ser	Asp	Glu	Lys 470	Ala	Thr	Asn	Pro	Ile 475	Val	Pro	Ser	Phe	Glu 480				
Met	Ser	Asn	Glu	Gly 485	Ser	Tyr	Phe	Phe	Gly 490	Asp	Asn	Ala	Glu	Glu 495	Tyr				
Asp	Asn	Gly	Gly 500	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly 505	Met	Ser	Leu	Leu	Thr 510	Glu	Val				
Glu	Thr	Tyr 515	Val	Leu	Ser	Ile	Val 520	Pro	Ser	Gly	Pro	Leu 525	Lys	Ala	Glu				
Ile	Ala 530	Gln	Arg	Leu	Glu	Asp 535	Val	Phe	Ala	Gly	Lys 540	Asn	Thr	Asp	Leu				
Glu 545	Ala	Leu	Met	Glu	Trp 550	Leu	Lys	Thr	Arg	Pro 555	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu 560				
Thr	Lys	Gly	Ile	Leu 565	Gly	Phe	Val	Phe	Thr 570	Leu	Thr	Val	Pro	Ser 575	Glu				
Arg	Gly	Leu	Gln 580	Arg	Arg	Arg	Phe	Val 585	Gln	Asn	Ala	Leu	Asn 590	Gly	Asn				
Gly	Asp	Pro 595	Asn	Asn	Met	Asp	Lys 600	Ala	Val	Lys	Leu	Tyr 605	Arg	Lys	Leu				
Lys	Arg 610	Glu	Ile	Thr	Phe	His 615	Gly	Ala	Lys	Glu	Ile 620	Ala	Leu	Ser	Tyr				
Ser 625	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala 630	Ser	Cys	Met	Gly	Leu 635	Ile	Tyr	Asn	Arg	Met 640				
Gly	Ala	Val	Thr	Thr 645	Glu	Val	Ala	Phe	Gly 650	Leu	Val	Cys	Ala	Thr 655	Cys				

ES 2 624 546 T3

Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Ala  
660 665 670

Thr Thr Asn Pro Leu Ile Lys His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser  
675 680 685

Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala  
690 695 700

Ala Glu Ala Met Glu Ile Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala  
705 710 715 720

Met Arg Thr Val Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp  
725 730 735

Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Thr Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln  
740 745 750

Met Gln Arg Phe Lys  
755

<210> 2  
<211> 2274  
<212> ADN  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> np-conector-m1 cds

<400> 2  
atggccagcc agggcaccaa gcggagctac gagcagatgg aaaccgacgg cgaccggcag 60  
aacgccaccg agatccgggc cagcgtgggc aagatgatcg acggcatcgg ccggttctac 120  
atccagatgt gcaccgagct gaagctgtcc gactacgagg gccggctgat ccagaacagc 180  
ctgaccatcg agaagatggt gctgtccgcc ttcgacgagc ggcggaacag atacctggaa 240  
gagcacccca gcgccggcaa ggaccccaag aaaaccggcg gaccatcta ccggcgggtg 300  
gacggcaagt ggatgcggga gctggtgctg tacgacaaag aggaaatccg gcggatctgg 360  
cggcaggcca acaacggcga ggacgccaca gccggcctga cccacatgat gatctggcac 420  
agcaacctga acgacaccac ctaccagcgg accagggccc tcgtgaggac cggcatggac 480  
ccccggatgt gcagcctgat gcagggcagc aactgcca gaagaagcgg agctgccgga 540  
gccgccgtga agggcatcgg caccatggtg atggaactga tccggatggt gaagcggggc 600  
atcaacgacc ggaatTTTTG gaggggcgag aacggcagaa agactagaag cgctacgag 660  
cggatgtgca acatcctgaa gggcaagtTC cagacagccg cccagcgggc catggtggac 720  
caggtccggg agagccggaa ccccggcaac gccgagatcg aggacctgat cttcctggcc 780

10

ES 2 624 546 T3

cgggccgccc tgatcctgcg gggcagcgtg gcccacaaga gctgcctgcc cgctgcgtg 840  
 tacggccctg ccgtgagcag cggctacgac ttcgagaaag agggctacag cctggtcggc 900  
 atcgaccctt tcaagctgct gcagaacagc cagggtgaca gcctgatccg gcccaacgag 960  
 aaccccgccc acaagtccca gctggctctg atggcctgcc acagcgcgcg cttcgaggat 1020  
 ctgcggtgct tgtccttcat ccggggcacc aagggtgtccc ccaggggcaa gctgtccacc 1080  
 agaggcgtgc agatcgccag caacgagaac atggacaaca tgggcagcag caccctggaa 1140  
 ctgcgggagcg gctactgggc catccggacc cggctccggcg gcaacaccaa ccagcagcgg 1200  
 gccagcgcg gacagatcag cgtgcagccc accttctccg tgcagcggaa cctgcccttc 1260  
 gagaagagca ccgtgatggc gccttcacc ggcaacaccg agggccggac cagcgacatg 1320  
 cgggcccgaga ttatccggat gatggaaggc gccaaagccc aggaagtgag cttccggggc 1380  
 aggggcgtgt tcgagctgtc cgatgagaag gccaccaacc ccatcgtgcc cagcttcgag 1440  
 atgagcaacg agggcagcta cttcttcggc gacaacgccg aggaatacga caatggcggc 1500  
 ggaccaggcg gcggaatgag cctgctgacc gaggtggaga cctacgtgct gtccatcgtg 1560  
 cctagcggcc ctctgaaggc cgagatcgcc cagcggctgg aagatgtgtt cgccggcaag 1620  
 aacaccgacc tggaaaccct gatggaatgg ctgaaaacc ggccatcct gagccccctg 1680  
 accaagggca tcctgggctt cgtgttcacc ctgaccgtgc ccagcagcgc gggcctgcag 1740  
 cggcggagat tcgtgcagaa gcacctgaac ggcaacggcg accccaacaa catggataag 1800  
 gccgtgaagc tgtaccggaa gctgaagcgg gagatcacct tccacggcgc caaagagatc 1860  
 gccctgagct acagcgcgag agccctggcc agctgcatgg gcctgatcta caaccggatg 1920  
 ggcgccgtga ccaccgaggt ggccttcggc ctggtctgcg ccacctgcga gcagatcgcc 1980  
 gacagccagc acagatccca ccggcagatg gtggccacaa ccaaccctct gatcaagcac 2040  
 gagaaccgga tgggtctggc tagcaccacc gccaaaggca tggaaacagat ggccggcagc 2100  
 agcagcagc cgcgccgaagc catggaaatc gccagccagg ccagacagat ggtgcaggcc 2160  
 atgcccagc tgggcaccca ccccagcagc tccaccggcc tgcgggacga cctgctggaa 2220  
 aacctgcaga cctaccagaa acggatgggg gtgcagatgc agcggttcaa gtga 2274

<210> 3  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> conector

<400> 3  
 Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly  
 1 5

10

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 4  
 Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val  
 1 5

15

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Haemophilus influenzae



<400> 5  
Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile  
1 5

<210> 6

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

<400> 6

Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu  
1 5

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición adecuada para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T frente a un virus de la influenza en un vertebrado, comprendiendo dicha composición un vector viral que comprende ácidos nucleicos que codifican epítomos de proteínas internas del virus de la influenza, en donde dicho vector viral es un vector de MVA, en donde dicha composición comprende un ácido nucleico que codifica al menos dos de dichos epítomos, siendo al menos un epítomo de cada una de dos o más proteínas internas del virus de la influenza, en donde dichas proteínas internas comprenden nucleoproteína y proteína 1 de la matriz, en donde dichos epítomos se proporcionan en forma de una fusión de nucleoproteína - proteína 1 de la matriz, en donde dichas proteínas internas proceden del subtipo A/Panama/2007/99 de la cepa de la influenza H3N2, para su uso en el refuerzo de las respuestas de células T preexistentes contra la influenza.
- 10 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas proteínas están dispuestas en el orden extremo N - nucleoproteína - proteína 1 de la matriz - extremo C.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha nucleoproteína y proteína 1 de la matriz están separadas por una secuencia conectora.
- 15 4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha secuencia conectora tiene la secuencia de aminoácidos GGGPGGG.
5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico que codifica dichas proteínas internas y/o polipéptidos conectores ha sido optimizada para los codones para el uso de codones humanos.
- 20 6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dichos epítomos se proporcionan en forma de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.
7. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dichos epítomos están codificados por un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2.
- 25 8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente un coadyuvante.
9. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que induce respuestas de células T a los antígenos tanto NP como M1.
10. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dichas respuestas de células T son respuestas de células T CD8+.
- 30 11. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la preparación de un medicamento para reforzar las respuestas de células T preexistentes contra la influenza.
12. Un kit que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para reforzar las respuestas de células T de memoria preexistentes a la influenza.

35

Figura 1

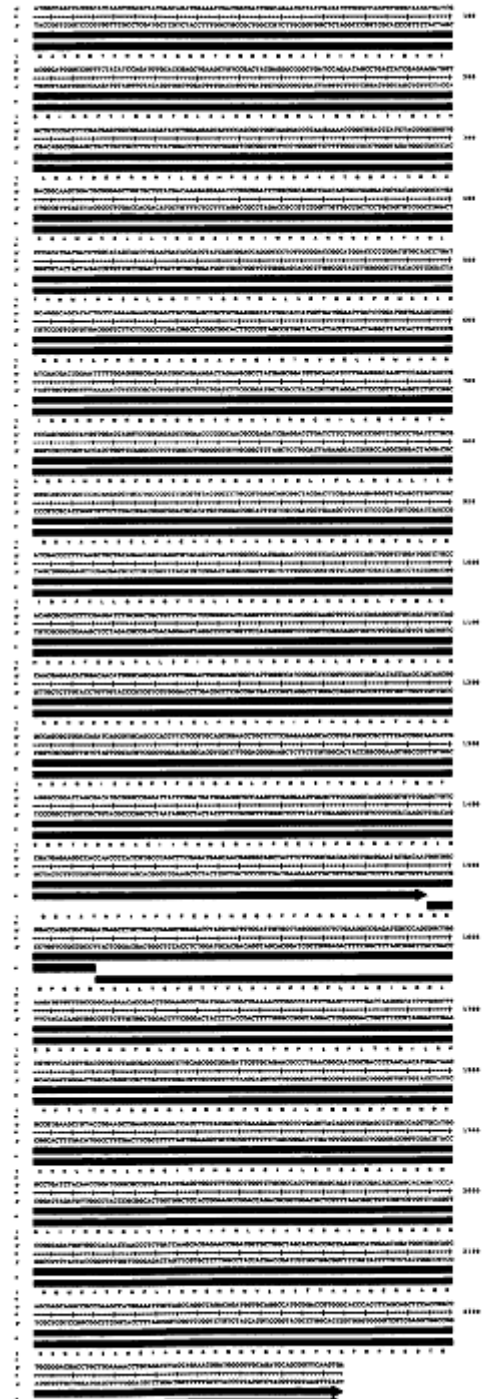


Figura 2

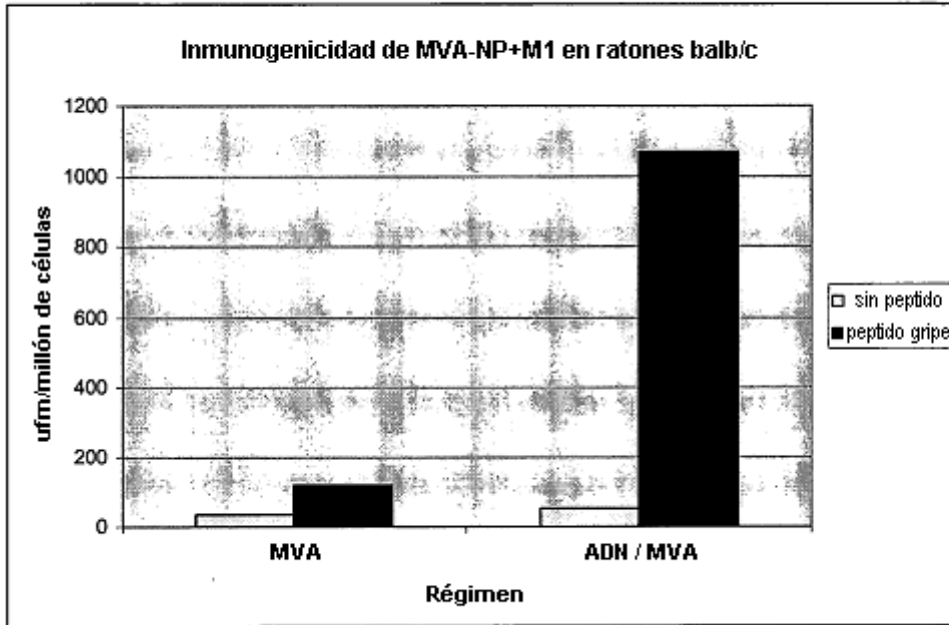


Figura 3

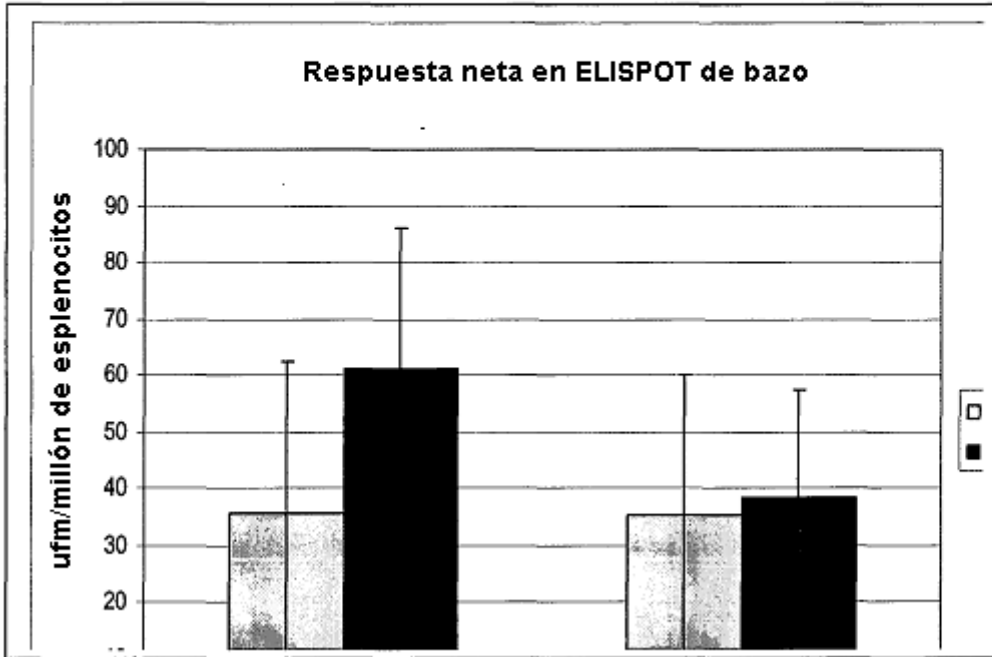


Figura 4

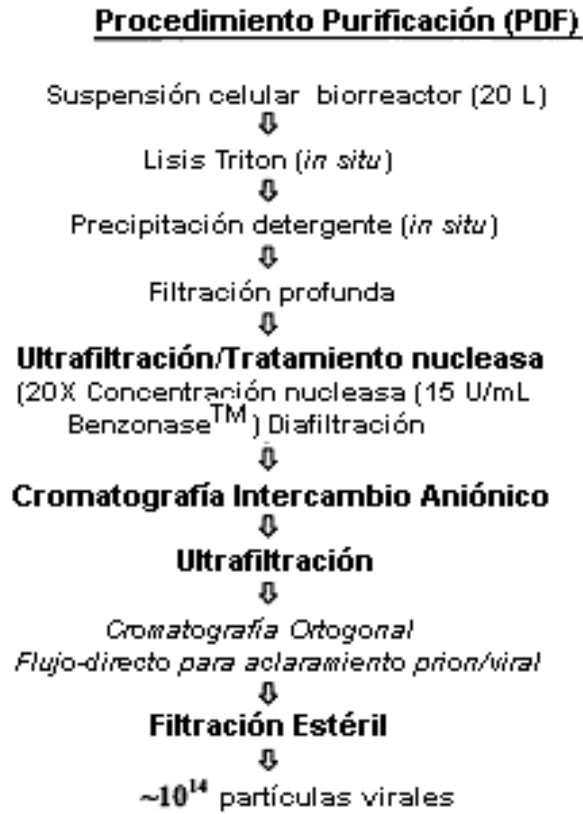
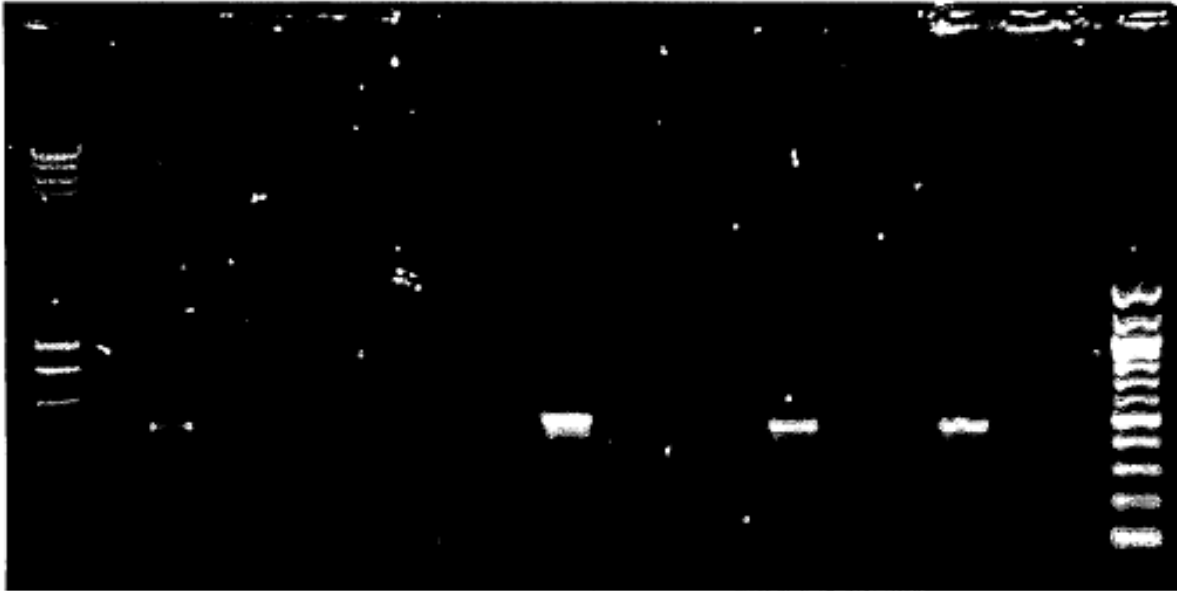


Figura 5

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



1 SmartLadder  
2 wt PCR: Ensayo  
3 wt PCR: wt MVA  
4 wt PCR: MVA  
5 wt PCR: MVA-  
6 wt PCR: destilado

7 blanco  
8 RFP PCR:  
9 RFP PCR: wt  
10 RFP PCR: MVA  
11 RFP PCR: MVA-  
12 RFP PCR: destilado

13 blanco  
14 NP+M1 PCR:  
15 NP+M1 PCR: wt  
16 NP+M1 PCR: MVA  
17 NP+M1 PCR: MVA-  
18 NP+M1 PCR: destilado

19 blanco  
20 NEB 100kb

Figura 6

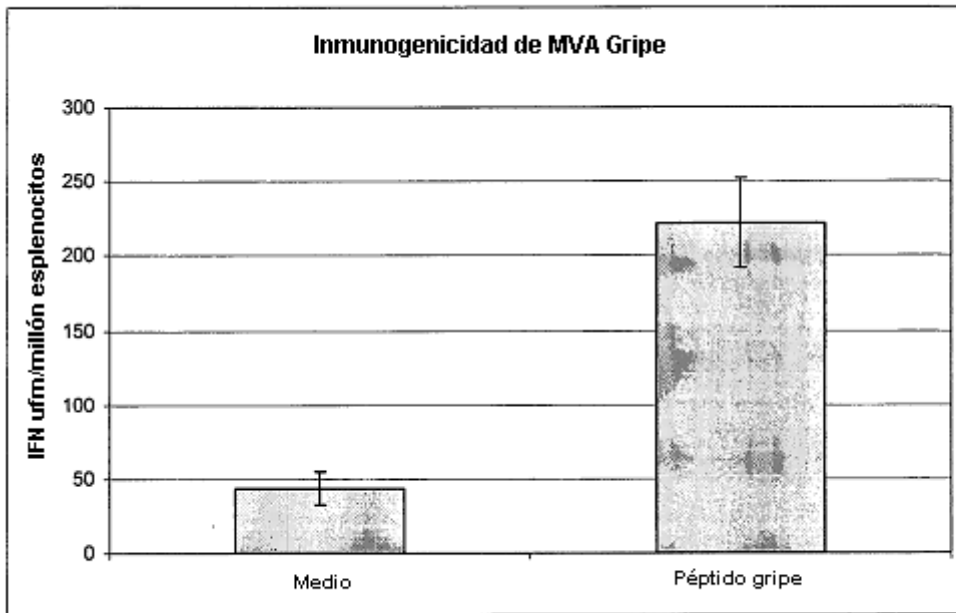




Figura 7

