

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 112**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2008 E 12164331 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2486939**

54 Título: **Vector adenoviral que codifica un antígeno de malaria**

30 Prioridad:

10.04.2007 GB 0706914
13.09.2007 GB 0717888

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2017

73 Titular/es:

OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(50.0%)
Buxton Court 3 West Way Botley
Oxford OX2 0JB , GB y
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (50.0%)

72 Inventor/es:

REYES, ARTURO;
HILL, ADRIAN;
O'HARA, GERALDINE;
COLLOCA, STEFANO y
CORTESE, RICCARDO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 642 112 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

Vector adenoviral que codifica un antígeno de malaria

Campo de la invención

5 La invención se refiere a vectores adenovirales recombinantes que son capaces de producir inmunidad contra el estadio pre-eritrocítico del ciclo vital del parásito de la malaria. En particular, la invención proporciona un vector adenoviral de simio recombinante que codifica un antígeno que comprende la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP), y también composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) que comprenden el vector y procedimientos de utilización de dichas composiciones.

Antecedentes de la invención

10 La malaria sigue siendo un importante problema sanitario en el mundo. Se ha estimado que al menos 3.000 millones de personas, casi la mitad de la población mundial, vive en áreas endémicas de malaria y se informa de entre 300 y 500 millones de casos clínicos y aproximadamente 1,5 millones de muertes anualmente [1]. El desarrollo de una vacuna eficaz sería un logro importante para ayudar a disminuir el problema de esta enfermedad. La estrategia de vacunación pre-eritrocítica ha demostrado alguna eficacia en ensayos clínicos de inmunidad contra este estadio del ciclo vital de la malaria dirigida hacia el esporozoito y esquizonte intrahepático posterior [2]. La respuesta inmunitaria celular había demostrado anteriormente que era importante en la inmunidad pre-eritrocítica con los linfocitos T CD8+ y la producción de IFN γ que tienen un papel principal en la protección contra el estadio hepático de la malaria [3].

15 La proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) es un antígeno expresado por los esporozoítos que se había demostrado anteriormente que inducía respuestas protectoras de linfocitos T CD8+ [4]. La TRAP se ha ensayado extensamente en ensayos clínicos de vacunas como una proteína de fusión con una cadena multiepítipo que contiene epítipos adicionales para linfocitos B, linfocitos T CD8+ y CD4+ de varios antígenos de malaria, que se conoce como ME.TRAP [5, 6].

20 Los vectores vacunales basados en ADN plasmídico o virus vacuna Ankara (MVA) modificado que codifican el antígeno ME.TRAP se han ensayado en el campo (Moorthy y col. (2004) PLoS, Med 1(2): e33) y muestran que inducen altas frecuencias de linfocitos T efectores cuando se utilizan en un régimen de sensibilización-refuerzo.

25 No obstante, sigue existiendo la necesidad de vacunas anti-malaria mejoradas que sean capaces de prevenir la infección natural con el *Plasmodium falciparum* en sujetos humanos, así como para inducir respuestas más fuertes de linfocitos T, particularmente del tipo CD8+. En ensayos clínicos de ME.TRAP como inserción en ambos vectores ADN y poxvirus, tal como MVA y viruela aviar, las respuestas eran predominantemente del tipo CD4+ que probablemente es menor protector que las respuestas de linfocitos T CD8+.

30 Los vectores adenovirales del serotipo humano 5, se habían utilizado anteriormente en un modelo de ratón de *P. yoelii* de malaria y han demostrado una inmunogenicidad espectacular y una protección significativa después de solo una única dosis [7]. Sin embargo, una limitación principal que evita el uso de este serotipo en humanos es la presencia ubicua del AdH5, con infecciones frecuentes en la infancia que da como resultado a seroconversión. Para sortear este problema de la inmunidad pre-existente a AdH5, ha habido un interés creciente en el uso de serotipos adenovirales de origen simio que no circulan en poblaciones humanas, con varios estudios que demuestran la capacidad de estos vectores para dar lugar a respuestas de linfocitos T CD8+ tanto en modelos de ratón como de primates no humanos de SARS [8] y VIH [9, 10].

35 Li y col. (2007, Vaccine 25: 2567) desvela los estudios preliminares utilizando ME.TRAP sugieren que los vectores de simio son muy eficaces en la inducción de respuestas de linfocitos T restringidos a CD8+.

40 El documento WO2005/071093 desvela varios aislados de adenovirus de chimpancé recombinantes, incluyendo el aislado 63.

Sumario de la invención

45 Los presentes inventores han demostrado ahora que los vectores adenovirales de simio (particularmente los derivados del adenovirus aislado AdCh63 de chimpancé) que codifican el antígeno ME.TRAP pueden dar lugar a respuestas de linfocitos T CD8+ espectaculares, así como un alto título de respuesta de anticuerpo contra TRAP, durante un largo periodo de tiempo. Además, la inmunogenicidad se puede reforzar por la administración posterior de un vector MVA que codifica el mismo transgén, y se observa una fuerte inmunogenicidad en macacos Rhesus, una especie que se utiliza como un buen indicador de la posibilidad de inmunogenicidad en seres humanos. La inmunogenicidad se ha demostrado también en un estudio clínico en fase I en humanos. Los estudios de eficacia protectora del vector AdCh63 que codifica ME.TRAP en un modelo de desafío en ratón eran inesperadamente mayores que con otros vectores adenovirales. La eficacia en este modelo de ratón se ve ampliamente en el campo siendo un indicador útil y predictivo para seres humanos.

50 En un primer aspecto, la invención proporciona un vector de adenovirus de simio deficiente en cuanto a la

5 replicación recombinante que codifica un antígeno que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha integrado establemente un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 del adenovirus de chimpancé (AdCh63).

En todas las realizaciones, de la invención el antígeno codificado por el vector de adenovirus de simio puede comprender o consistir en ME.TRAP.

10 En una realización no limitante particular la invención proporciona un vector AdCH63 recombinante deficiente en replicación que codifica ME.TRAP, en el que la expresión de ME.TRAP está dirigida por la secuencia reguladora a que comprende el promotor del CMV IE1 humano y un fragmento de la región 5' sin traducir del gen del CMV IE1 humano que incluye el intrón A (al que también se hace referencia en el presente documento como el promotor HCMV "largo").

15 En un segundo aspecto la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende el vector de adenovirus de simio de acuerdo con el primer aspecto de la invención mezclado con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona una composición vacunal que comprende el vector de adenovirus de simio de acuerdo con el primer aspecto de la invención mezclado con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

20 En particular, la divulgación proporciona una composición inmunogénica o una composición vacunal que comprende un vector adenoviral de simio deficiente en cuanto a la replicación recombinante (y particularmente un vector AdCH63) que codifica ME.TRAP, en el que la expresión de ME.TRAP está dirigida por el promotor de HCMV "largo". En particular, la composición inmunogénica o vacuna comprende dicho vector adenoviral formulado en 10 mM de Histidina, un 7,5 % de sacarosa, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, un 0,1 % de PS80, 0,1 mM de EDTA, un 0,5 % de etanol, pH 6,6, que es adecuado para la administración intradérmica a sujetos humanos.

25 La divulgación proporciona además un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria contra la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) en un sujeto humano, que comprende la administración al sujeto de una composición inmunogénica o una composición vacunal que comprende un vector adenoviral de simio recombinante que codifica TRAP (de acuerdo con el primer aspecto de la invención) en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmunitaria contra TRAP en dicho sujeto.

30 La composición inmunogénica o vacunal puede administrarse como una inmunización de dosis única.

Además, la divulgación proporciona un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria contra la proteína de adhesión relacionada con trombospondina (TRAP) en un sujeto humano, que comprende

35 i) administrar al sujeto una dosis de sensibilización de una composición inmunogénica o una composición vacunal que comprende un vector adenoviral recombinante de simio que codifica TRAP (de acuerdo con el primer aspecto de la invención); y

40 ii) administrar al mismo sujeto una dosis de refuerzo de una composición inmunogénica o vacunal que comprende un vector no adenoviral que codifica un antígeno que comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP), en el que la dosis de refuerzo se administra al menos dos semanas después de la dosis de sensibilización.

La dosis de refuerzo se puede administrar ocho semanas después de la dosis de refuerzo.

Se pueden administrar una o más dosis de refuerzo al mismo sujeto si fuera necesario con el fin de optimizar la respuesta inmunitaria producida en ese sujeto.

45 El vector no adenoviral que se administra en la etapa ii) es un vector de poxvirus recombinante, por ejemplo el variolovacunal Ankara (MVA).

La divulgación proporciona además un producto de combinación o un kit que comprende:

i) una composición de sensibilización que comprende un vector de adenovirus de simio que codifica un antígeno que comprende TRAP, o al menos un epítipo de linfocito T del mismo; y

50 ii) una composición de refuerzo que comprende un vector no adenoviral, en el que el vector no adenoviral también codifica un antígeno que comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma.

La composición de sensibilización comprende preferentemente un vector de adenovirus de simio que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se integra establemente un transgén que codifica al menos un antígeno unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma.

La composición de sensibilización y la composición de refuerzo pueden codificar ambos antígenos idénticos que comprenden la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma.

La composición de sensibilización y la composición de refuerzo pueden ambas codificar ME.TRAP.

En un aspecto adicional la invención proporciona un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha integrado establemente un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del adenovirus de chimpancé aislado 63 (AdCh63) para su uso como una vacuna. La invención también proporciona el uso de un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se integró establemente un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de célula T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 del adenovirus de chimpancé (AdCh63) en la fabricación de un medicamento para su uso en producir una respuesta inmunitaria contra la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) en un sujeto humano.

La invención proporciona adicionalmente además el uso de un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha integrado establemente un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 del adenovirus de chimpancé (AdCh63) en la fabricación de un medicamento para su uso como una vacuna anti-malaria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra esquemáticamente la construcción de un vector adenoviral ejemplar de acuerdo con la invención basada en el vector adenoviral AdCh63 de chimpancé que codifica el antígeno ME.TRAP. La Fig. 1a muestra el plásmido pSG2 ME.TRAP. La Fig. 2 muestra un fragmento de 4,7 kb escindido del pSG2 ME.TRAP por digestión con Afel y Sall. Este fragmento contiene el promotor de HCMV, el Intrón A, la secuencia ME.TRAP y BHG polIA. La Fig. 1c ilustra el vector receptor preChAd63NSmut que porta la región no estructural (NS) del virus de la hepatitis C bajo el control de HCMV y BGHpA. La Fig. 1d ilustra el pre-plásmido pChAd63 que contiene el antígeno ME.TRAP.

La Figura 2 ilustra la inmunogenicidad de AdCh63ME.TRAP tras una única sensibilización. Se inmunizaron ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad con 1×10^{10} pv de vectores adenovirales de simio AdCh63 y AdC9 que codificaban ME.TRAP. Se analizó la inmunogenicidad en la sangre por ELISpot el día 7, 12 y 60 post-inmunización.

La Figura 3 ilustra la protección estéril y la eficacia de vectores adenovirales de simio AdCh63 y AdC9 que codifican ME.TRAP contra un desafío parasitario. Los ratones BALB/c se inmunizaron con vectores adenovirales (1×10^{10} pv) y luego se desafiaron 14 días ($n = 6$) y 60 días ($n = 6$) más tarde mediante administración i.v. de 1000 esporozoítos de *Plasmodium berghei*.

La Figura 4 ilustra la inmunogenicidad de regímenes de sensibilización-refuerzo con adenovirus MVA. Los ratones BALB/c se vacunaron con (5×10^9) de vectores adenovirales de simio AdCh63 y AdC9 que codifican ME.TRAP. Todos los ratones se re-inmunizaron 8 semanas más tarde con MVA ME.TRAP (1×10^7 ufp) y se evaluaron las respuestas de linfocitos T por citometría de flujo tras 14 días (a) y por ELISpot los días 63 y 182 post-refuerzo (b). También se cuantificó la inducción de anticuerpos IgG por ELISA 28 días después del refuerzo con MVA (c).

La Figura 5 ilustra la protección estéril y la eficacia de regímenes de sensibilización-refuerzo con adenovirus MVA frente a un desafío con el parásito. Los ratones BALB/c se inmunizaron inicialmente con vectores adenovirales (5×10^9 pv) y posteriormente se reforzaron tras 8 semanas con MVA (1×10^7 ufp) que codifica ME.TRAP. Los ratones se desafiaron tras 14 (a), 63 (b) y 182 (c) días mediante inyección i.v. de 1000 esporozoítos de *Plasmodium berghei*.

La Figura 6 ilustra la inmunogenicidad de regímenes de sensibilización con AdCh63 ME.TRAP, y refuerzo con MVA ME.TRAP en macacos Rhesus. Los macacos se inmunizaron por vía intramuscular e intradérmica con AdCh63 ME.TRAP (5×10^{10} pv) y se reforzaron 8 semanas más tarde con MVA ME.TRAP (2×10^8 ufp). Se llevó a cabo un ELISPOT IFN γ en la sangre tras la inmunización a) cinéticas de la respuesta inmunitaria con sensibilización-Ad y refuerzo MVA que muestra las respuestas totales de ME.TRAP en la sangre. b) respuesta de IFN γ a los agrupamientos peptídicos que abarcan la secuencia completa de ME.TRAP 4 semanas después de la sensibilización y una semana después del refuerzo (c).

La Figura 7 ilustra esquemáticamente dos regímenes diferentes de sensibilización-AdCh63 ME.TRAP, refuerzo MVA ME.TRAP ensayados en macacos Rhesus. El tiempo (T) representa semanas. En cada caso la vacuna de sensibilización era con AdCh63 ME.TRAP (5×10^{10} pv administradas por vía intramuscular o intradérmica) y el refuerzo 8 semanas después con MVA ME.TRAP (2×10^8 ufp administradas por vía intradérmica).

La Figura 8 también ilustra la inmunogenicidad de regímenes de sensibilización-AdCh63 ME.TRAP, refuerzo con MVA ME.TRAP en macacos Rhesus, comparando la respuesta de linfocitos T a TRAP y los títulos de anticuerpo. El panel (a) muestra la respuesta de linfocitos T a TRAP determinada utilizando ELISpot IFN γ en agrupamientos peptídicos de TRAP durante el curso de tiempo del estudio de vacunación descrito en los ejemplos adjuntos (T = tiempo en semanas). Los sujetos del grupo 1 recibieron dosis de refuerzo de MVA ME.TRAP a la 8 y 24 semanas, mientras que el grupo 2 recibió una dosis de refuerzo de MVA ME.TRAP a las 8, 16 y 24 semanas. Una única inmunización con AdCh63 ME.TRAP producía una fuerte respuesta de linfocitos T de aproximadamente 1000 UFS por millón de PBMC. El panel (b) muestra el curso en el tiempo del título de anticuerpos medidos contra proteína TRAP para 7 individuos, demostrando que se inducían fuertes títulos de anticuerpo con la vacunación con AdCh63 ME.TRAP, y el refuerzo con MVA ME.TRAP.

La Figura 9 muestra el curso en el tiempo de la inmunogenicidad de linfocitos T en un ensayo clínico en fase I de AdCh63 ME.TRAP en sujetos humanos, evaluado por ELISpot IFN γ frente a agrupamiento de 15meros que se solapan con la inserción vacunal (T9/96 TRAP 15meros), y frente a la misma secuencia con solapamiento de péptidos 20meros (T9/96 TRAP 20meros). También se muestra la respuesta frente a péptidos 20meros que representan la cepa heteróloga de *P. falciparum* (3D7 TRAP 20meros) y la respuesta frente a una cadena corta de epítomos peptídicos de malaria principalmente noánmeros en la cadena poliepítomo ME (Gilbert y col., Nature Biotech. 1997, Nov: 15, 1280-84) (ME).

Descripción detallada de la invención

En los siguientes párrafos se describen con más detalle distintos aspectos de la divulgación. Cualquier característica descrita como preferida en conexión con un aspecto de la divulgación también se prefiere en relación con otros aspectos de la divulgación a menos de que se establezca otra cosa.

Los presentes inventores han construido vectores adenovirales de simio que expresan un antígeno heterólogo que comprende el antígeno de la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) de malaria pre-eritrocítica (esporozoítos) y han observado que dichos vectores son capaces de dar lugar a respuestas fuertes de linfocitos T CD8+ en dos modelos animales diferentes. El nivel de respuesta de linfocitos T que se produce utilizando el vector adenoviral de simio que expresan el antígeno TRAP era inesperadamente alto, particularmente cuando se ensayaba en un modelo de primate, indicando que la combinación de vector adenoviral de simio y el antígeno TRAP era particularmente potente para producir inmunidad contra este antígeno de malaria pre-eritrocítica.

Un aspecto principal de la invención es por lo tanto la provisión de un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha integrado establemente un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos uno de los epítomos de linfocito T de la misma y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 del genoma de adenovirus de chimpancé (AdCh63).

Los vectores adenovirales, y especialmente los vectores adenovirales de simio, se conocen en general en la técnica. Se describen varios adenovirus de simio recombinantes deficientes en la replicación, en el documento WO 2005/071093.

Los vectores adenovirales de simio de la invención comprenden normalmente un genoma adenoviral de simio que se modifica por inserción estable de un casete de expresión transgénico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno TRAP unido operativamente a secuencias reguladoras que son capaces de dirigir la expresión del antígeno TRAP en una célula de mamífero.

Los vectores adenovirales recombinantes de simio de la invención son normalmente "deficientes en la replicación", que significa que se han vuelto incapaces de replicarse debido a una eliminación funcional, o eliminación completa, de un gen que codifica un producto genético esencial para la replicación vírica. A modo de ejemplo, los vectores de la invención se han vuelto deficientes en la replicación por la retirada de todo o parte del gen E1, y opcionalmente también de la región E3 y/o la región E4. La región E4 nativa del adenovirus de simio se puede sustituir por el del

adenovirus humano, por ejemplo Ad5E4orf6. Las características generales de vectores adenovirales de simio “deficientes en la replicación” se conocen en la técnica, por ejemplo a partir del documento WO 2005/071093.

5 El vector adenoviral recombinante de la invención se basa en el genoma del adenovirus AdCh63 aislado de chimpancé. Este serotipo vírico particular se conoce en la técnica (por ejemplo a partir del documento WO 2005/071093) pero nunca se había descrito anteriormente como un vehículo vacunal para el antígeno TRAP pre-eritrocítico de *Plasmodium spp.* Los inventores han observado que la combinación de la estructura del vector ADCh63 que expresa un antígeno TRAP induce una respuesta de linfocitos T CD8+ espectacular, y tiene la ventaja adicional de producir una fuerte respuesta de anticuerpos específicos de TRAP (IgG).

10 El vector de la invención puede expresar un antígeno TRAP de longitud completa, o un fragmento del mismo que comprende al menos un epítipo de linfocitos T. Normalmente el fragmento que comprende al menos un epítipo de linfocito T tendrá al menos nueve aminoácidos de longitud, y puede tener cualquier longitud hasta la longitud completa de TRAP o ME.TRAP. Por ejemplo, el fragmento puede tener un intervalo de 9 a 200, o de 9 a 100, o de 9 a 50 aminoácidos de longitud. Las posiciones de los epítopos de linfocitos T en la secuencia de TRAP se habían descrito anteriormente en la bibliografía y las conocerán bien los expertos en la técnica. Se describen ejemplos de
15 epítopos de TRAP de linfocitos T en las siguientes publicaciones: Aidoo M, Lalvani A, Allsopp CE, Plebanski M, Meisner SJ, Krausa P, Browning M, Morris-Jones S, Gotch F, Fidock DA, y col. Lancet. 1995; 345:1003-7; Flanagan KL, Plebanski M, Akinwunmi P, Lee EA, Reece WH, Robson KJ, Hill AV, Pinder M. Eur J Immunol. 1999 Jun; 29:1943-54; y Flanagan KL, Plebanski M, Odhiambo K, Sheu E, Mwangi T, Gelder C, Hart K, Kortok M, Lowe B, Robson KJ, Marsh K, Hill AV. Am J Trop Med Hyg. 2006 Mar 74(3):367-75.

20 El antígeno TRAP se puede derivar de cualquier especie de *Plasmodium*, pero normalmente será un antígeno TRAP de una cepa de *Plasmodium falciparum*. La secuencia de antígeno TRAP puede ser de cualquier cepa de *Plasmodium falciparum*, pero en una realización particular (no limitante) el antígeno TRAP es de la cepa de *Plasmodium falciparum* T9/96. Los antígenos TRAP de diferentes cepas de *Plasmodium falciparum* presentan un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos (normalmente mayor del 90 % respecto a la secuencia TRAP de longitud completa). Por lo tanto, se contempla el uso de cualquier secuencia de aminoácidos TRAP que comparta
25 más de un 90 %, más de un 95 %, o más de un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el antígeno TRAP de la cepa T9/96 de *Plasmodium falciparum*.

30 El antígeno TRAP (o el fragmento de epítipo de linfocitos T del mismo) se puede expresar solo o en combinación con secuencias polipeptídicas adicionales, por ejemplo como una proteína de fusión. Estas secuencias polipeptídicas adicionales pueden comprender epítopos de linfocitos B, linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+, y específicamente epítopos de linfocitos B o linfocitos T de antígenos de *Plasmodium falciparum* distintos de TRAP. Una combinación particularmente ventajosa es la construcción denominada ME.TRAP, que comprende un antígeno TRAP de longitud completa fusionado con una cadena multiepítipo de epítopos de linfocitos B, linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ de otros antígenos pre-eritrocíticos de *Plasmodium falciparum*, (5, 6). El antígeno ME.TRAP
35 descrito en la bibliografía (y que se muestra como SEQ ID NO: 2) contiene la secuencia TRAP de longitud completa obtenida de la cepa T9/96 de *Plasmodium falciparum*. Sin embargo, se apreciará que la parte TRAP de esta construcción ME.TRAP se puede sustituir por secuencias TRAP de otras cepas de *Plasmodium falciparum*. Los lectores expertos apreciarán también que la secuencia TRAP (y/o la secuencia ME) podría modificarse por una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos sin alterar sustancialmente la inmunogenicidad de linfocitos T (o linfocitos B).
40

En una realización específica, no limitante, el antígeno ME.TRAP puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2. Otras secuencias de antígeno TRAP adecuadas se describen por Robson KJ, y col. Nature. 1988; 335:79-82. La cadena de epítopos ME se describe por Gilbert SC, y col., Nat Biotechnol. 1997;15(12):1280-4.

45 Las secuencias reguladoras que dirigen la expresión del antígeno TRAP pueden incluir secuencias de inicio de la transcripción, secuencias promotoras, o secuencias amplificadoras y combinaciones de las mismas. La secuencia promotora es normalmente un promotor heterólogo (con respecto al adenovirus y el antígeno expresado) y puede ser cualquier promotor que reconozca la ARN polimerasa de eucariotas (por ejemplo, ARN polII).

50 Un promotor preferido es el promotor inmediato temprano (IE1) de citomegalovirus humano (CMV), que está descrito por Chapman y col. NAR, 19: 3979-3986. Este promotor puede utilizarse en forma “larga” que incluye un fragmento de la región no traducida 5’ del gen IE1 que comprende la secuencia de intrón A, o en una forma “corta” que carece de la secuencia de intrón A. El promotor CMV “largo” se prefiere en general y normalmente excluye el exón B. Sin embargo, se tiene que entender que la invención no se limita al uso del promotor HCMV “largo” para dirigir la expresión del antígeno TRAP. Se pueden utilizar otros promotores heterólogos que dirijan un nivel adecuado de
55 expresión del antígeno, incluyendo promotores cuyos niveles de expresión sean sustancialmente equivalentes a los alcanzados utilizando el promotor HCMV “largo”. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor CMV murino, el promotor del virus del Sarcoma de Rous (RSV), los promotores tempranos/tardíos SV40 y el promotor beta-actina.

El casete de expresión transgénica (que codifica el antígeno que comprende TRAP) normalmente incluirá también

una secuencia terminadora de la transcripción heteróloga. Se puede utilizar cualquier secuencia terminadora ARNpollI adecuada, por ejemplo, la secuencia BGH poliA. La combinación del promotor HCMV "largo" y la secuencia BGH poliA es particularmente ventajosa y se prefiere para su uso en la estructura del vector AdCh63.

5 El casete de expresión transgénica (que codifica el antígeno que comprende TRAP) se insertará normalmente en la región E1 eliminada del genoma del adenovirus de simio. Sin embargo, se debería entender que la localización precisa del sitio de inserción y la orientación del casete de expresión transgénica en el vector no es crítica siempre que 1) el casete de expresión transgénica sea funcional, en el sentido de que sea capaz de dirigir la expresión del antígeno que comprende TRAP después de la inserción en el genoma adenoviral y 2) la inserción del transgén no evite la replicación y/o empaquetamiento del vector adenoviral en partículas víricas infecciosas en una línea celular huésped adecuada.

10 Los vectores adenovirales de simio de la invención se suministran normalmente y se utilizan como partículas víricas infecciosas que comprenden el genoma de adenovirus recombinante que codifica el antígeno TRAP. Los adenovirus defectuosos en replicación pueden cultivarse en un cultivo tisular para producir altos títulos de partículas víricas infecciosas, utilizando líneas celulares que proporcionan los productos genéticos omitidos esenciales para la replicación vírica y el empaquetamiento *in trans*. Las secuencias de estructura adenoviral(genoma) se pueden clonar en vectores plásmidos bacterianos con el fin de facilitar la clonación y modificación utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales. Dichos plásmidos representan "clones moleculares" del vector adenoviral correspondiente, y contienen el genoma adenoviral recombinante completo. Después de la digestión por enzimas de restricción del vector plásmido para retirar las secuencias bacterianas y exponer las repeticiones terminales invertidas, el ácido nucleico resultante se puede utilizar para transfectar una línea celular huésped adecuada que suministra la función genética esencial eliminada de la secuencia genómica vírica (por ejemplo, el producto genético E1), generando partículas víricas recombinantes puras. Un ejemplo adecuado es la línea celular HEK 293, que soporta el crecimiento de adenovirus con E1 eliminado. Otra línea celular adecuada es la denominada PerC6.

20 Aunque la invención se refiere en primer lugar a partículas adenovirales de simio recombinantes que se pueden administrar en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, vacunas, se tiene que entender que los vectores plásmidos correspondientes, que comprenden la estructura adenoviral de simio con un casete de expresión TRAP o (ME.TRAP) integrado establemente en forma de vector plásmido, también forman parte de la invención. Dichos vectores plásmidos son útiles en la producción de materias primas con altos títulos de partículas adenovirales que comprenden el genoma de adenovirus recombinantes que codifican el antígeno TRAP (o ME.TRAP).

30 Composiciones inmunogénicas

La invención también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden el vector de adenovirus de simio de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Dichas composiciones comprenden normalmente el vector adenoviral de simio en forma de partículas adenovirales infecciosas mezcladas con uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

35 En una realización la composición puede ser una composición vacunal que es adecuada para la administración a seres humanos y que se pueda utilizar para dar lugar a una respuesta inmunitaria protectora (tal como por linfocitos CD8+, a menudo citotóxicos) contra al menos el antígeno TRAP.

Las características preferidas de los vectores adenovirales de simio descritas en conexión con el primer aspecto de la invención también se aplican a las composiciones de la invención.

40 Las composiciones de la invención se formularán normalmente en forma de dosificación líquida que comprenden partículas adenovirales en un vehículo líquido adecuado, por ejemplo un vehículo acuoso tal como Histidina 10 mM, un 7,5 % de sacarosa, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, un 0,1 % de PS80, 0,1 mM de EDTA, un 0,5 % de etanol, pH 6,6, PBS libre de endotoxinas o cualquier otro vehículo adecuado. Las formas de dosificación preferidas se formulan para administración intramuscular o intradérmica, aunque no se excluyen otras vías de administración tales como la intravenosa, mucosa, transdérmica, etc. Las composiciones vacunales o inmunogénicas que se pretenden para la administración a seres humanos contienen normalmente partículas víricas con un título en el intervalo de desde 1-3 x 10¹¹ pv/ml.

Procedimientos de producción de una respuesta inmunitaria

50 Las composiciones que comprenden el vector adenoviral de simio de la invención se pueden administrar a sujetos humanos con el fin de producir una respuesta inmunitaria contra el antígeno TRAP codificado. Los inventores han demostrado que los vectores de acuerdo con la invención pueden dar lugar a una fuerte respuesta de linfocitos T CD8+ en modelos animales. En particular, la eficacia protectora que se presenta con el vector AdCh63 que codifica ME.TRAP en un modelo de desafío en ratón es inesperadamente bastante mayor que con otros vectores adenovirales. La eficacia en este modelo se ve ampliamente en el campo siendo un indicador útil y predictivo para seres humanos y por lo tanto, la vacuna que comprende AdCh63 que codifica ME.TRAP será útil en la protección de seres humanos contra la malaria. Además, los inventores ya han demostrado en un ejemplo que una vacuna que comprende AdCh63 que codifica ME.TRAP es inmunogénica en seres humanos.

La divulgación se refiere además a la administración de las composiciones de acuerdo con la invención (y en particular las composiciones que comprenden el vector AdCh63 que codifica el antígeno ME.TRAP) a sujetos humanos en una inmunización única o como parte de un régimen de dosificación más amplio, por ejemplo, un régimen sensibilización-refuerzo.

- 5 Los sujetos humanos que reciben las inmunizaciones con los vectores adenovirales de simio de la invención pueden ser sujetos humanos que se desea inmunizar contra la malaria.

Para los regímenes de inmunización única, los sujetos recibirán normalmente una dosis en el intervalo de desde 1×10^8 a 5×10^{10} partículas víricas. Esta dosis se administrará en general por vía intradérmica, pero no se excluyen otros regímenes de tratamiento que implican dosificaciones y vías de administración alternativas.

- 10 Los regímenes sensibilización-refuerzo implicarán normalmente una dosis de sensibilización de adenovirus recombinantes de simio que expresan el antígeno que comprende TRAP (y en particular ME.TRAP) en un primer punto de tiempo, seguida por la administración de una dosis de refuerzo de un vector no adenoviral que codifica un antígeno que comprende TRAP (o ME.TRAP) en un segundo punto de tiempo. El primer y segundo punto de tiempo se separarán al menos dos semanas, y normalmente aproximadamente 8 semanas.
- 15 El vector no adenoviral que se utiliza para administrar la dosis de refuerzo puede ser cualquier vector no adenoviral que codifique un antígeno que comprende TRAP (o ME.TRAP) Ejemplos adecuados incluyen vectores víricos, particularmente vectores víricos de viruela recombinante (por ejemplo, MVA), y vectores de ADN plasmídico.

- 20 Una combinación preferida (pero no limitante) utiliza AdCh63 recombinante que codifica el antígeno ME.TRAP para la dosis de sensibilización y MVA que codifica ME.TRAP para la dosis de refuerzo (por ejemplo, a una dosis en el intervalo de desde 1×10^7 a 1×10^8 ufp). En un régimen preferido (pero de nuevo no limitante), ambas dosis se administran por vía intradérmica y las dosis de sensibilización y de refuerzo se separan un periodo de 8 semanas.

- 25 Los linfocitos T inducidos por la vacuna y regímenes de vacunación descritos en el presente documento pueden ser útiles para la prevención y tratamiento de la malaria. Pero tienen también otras aplicaciones. Se pueden utilizar para generar reactivos para su uso en el diagnóstico de malaria tal como en el uso de linfocitos T para diagnosticar la infección de malaria. O los linfocitos T pueden tener valor en protocolos de transferencia de linfocitos T para la inmunoterapia de malaria. También se puede utilizar la capacidad de un individuo para generar respuestas inmunitarias suficientes como medición de la inmunocompetencia, para la exclusión de defectos inmunitarios o genéticos específicos.

La invención se entenderá adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitantes.

30 **Ejemplo 1**

Producción del vector AdCh63ME.TRAP

El AdCh63 ME.TRAP es un vector adenoviral de simio deficiente en replicación que expresa ME.TRAP que se utiliza en una vacunación para prevenir la malaria.

- 35 El AdCh63 ME.TRAP, consiste en el adenovirus de simio, serotipo 63 de adenovirus de chimpancé, que contiene una secuencia de genes que expresa una serie de epítomos de linfocitos T citotóxicos, (CTL), conocidos de antígenos de *Plasmodium falciparum* en estadio pre-eritrocítico, fusionados con un antígeno completo de estado pre-eritrocítico, la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP).

- 40 Los epítomos de CTL individuales que constituyen la parte de 'epítomo múltiple' de ME.TRAP, representa una variedad de antígenos diana potencialmente protectores y se incluyen para asegurar una respuesta inmunitaria a la vacuna en la mayoría de la población vacunada. El TRAP es un antígeno de estadio pre-eritrocítico abundante. Los voluntarios humanos inmunizados con esporozoítos irradiados y protegidos contra la malaria desarrollan respuestas de linfocitos T contra TRAP haciendo que sea un fuerte candidato para la inclusión en una vacuna de malaria.

La secuencia de nucleótidos de la inserción vacunal se muestra como SEQ ID NO: 1.

- 45 Se utilizó el plásmido pChAd63 ME.TRAP como material de partida para la producción de AdCh63 ME.TRAP. Para producir este plásmido se clonó un casete de expresión ME.TRAP en un vector receptor pre-adeno alineado por medio de recombinación homóloga. La construcción de este plásmido se ilustra esquemáticamente en la Figura 1.

El plásmido pSG2 ME.TRAP (Fig. 1a) se escindió con Afel y Sall para escindir un fragmento de 4,7 kb que contenía el promotor HCMV, ME.TRAP y la secuencia BGHpoliA.

- 50 El fragmento de ME.TRAP de 4,7 kb resultante (Fig. 1b) que también contenía el promotor HCMV, el intrón A y la secuencia BGH poliA se recombinó en un vector receptor preChAd63NSmut que albergaba la región no estructural (NS) del virus de la hepatitis C bajo el control de HCVM y BGHPA (Fig. 1c). El vector pChAd63 se deriva del genoma de adenovirus 63 de chimpancé tipo silvestre clonado en un vector plásmido que alberga las siguientes modificaciones en diferentes regiones de la estructura vírica de pChAd63:

- 1) eliminación de la región E1 (desde el pb 455 al pb 3421) del genoma vírico
- 2) eliminación de la región E3 desde el pb 27207 al pb 31788
- 3) eliminación de la región E4 desde el pb 33834 al pb 36216
- 4) inserción del Ad5E4orf6 desde el pb 33319 al pb 34200

5 El vector receptor, ChAd63 (c) NSmut se alineó escindiéndolo con HpaI y SnaBI. Se clonó el casete ME.TRAP en el vector pre-adeno por recombinación homóloga en *E. coli*. Las células BJ 5183 se co-transformaron con ~ 30 ng de vector receptor alineado (Δ HpaI, Δ SnaBI) y ~ 100 ng de pSG2 ME.TRAP digerido (Δ AfeI, Δ SaII). Se produjo la recombinación entre el fragmento de 4,7 kb y el vector receptor ChAd63NSmut pre-adeno dando como resultado la inserción del fragmento de 4,7 kb (que contenía el promotor HCMV, el gen ME.TRAP y la secuencia BGH PoliA) en el vector adenoviral, explotando la homología existente entre el promotor HCMV y las secuencias BGH PoliA. Los clones positivos se identificaron por análisis de la digestión de restricción con HindIII y EcoRI.

10 La Figura 1d es un mapa del nuevo vector ChAd63 que contiene el antígeno ME.TRAP. Se muestran los sitios HindIII y EcoRI. La confirmación de la identidad del ADN plasmídico se obtuvo por análisis de enzimas de restricción y secuenciación. Se observaron los perfiles de enzimas de restricción HindIII-EcoRI esperados por electroforesis en gel de agarosa en cuanto a los fragmentos que contenían ME.TRAP. El análisis de secuencia se llevó a cabo con diferentes oligos confirmando que la secuencia de la inserción ME.TRAP era la correcta.

Fabricación de virus primario como materia prima, (PVS)

Preparación de células HEK 293

↓

Alineamiento del plásmido ADN

↓ *transfección*

Inicio de la infección con adenovirus

↓

Recolección de adenovirus

20 La línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) es una línea permanente de riñón embrionario humana primaria que se transforma por ADN recortado del adenovirus humano tipo 5. Las células son particularmente sensibles a adenovirus humanos y soportarán el crecimiento de los adenovirus deficientes en replicación con E1A eliminados. Las células HEK 293 se obtuvieron en Bio Reliance, Todd Campus, West of Scotland Science Park, Glasgow G20 OXA.

25 La línea celular HEK 293 se cultivó como células adherentes. Las células se cultivaron sin antibióticos en DMEM suplementado con glutamina y un 10 % de suero bovino fetal cualificado, (FBS), en condiciones estériles.

Para producir el PVS, se transfectaron las células HEK 293 en fase logarítmica con 5 μ g de ADN plasmídico alineado con PmeI utilizando el reactivo de transfección liposoma catiónico definido químicamente, Lipofectamina 2000, de Invitrogen (18 horas tras la siembra).

30 La enzima de restricción PmeI y el tampón específico se adquirió en New England Biolabs (NEB). El BSA en este tampón se definió como de origen de EE. UU. Se utilizaron cuatro unidades de PmeI (10.000 U/ml) para alinear 1 μ g de ADN. Se utilizó agua estéril para la dilución. Se utilizó medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin suero fetal bovino, (FBS) para el estadio de transfección (la presencia de FBS reduce la eficacia de la transfección). Las células transfectadas se recolectaron el día 10 cuando se observó el máximo efecto citopático (CPE). Los virus se recolectaron de las células por tres rondas de congelación descongelación y se agruparon con el sobrenadante celular en un 10 % de glicerol estéril con un volumen final de 4,1 ml. Los viales de PVS se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C. Se asignó a esta materia prima una fecha de 6 meses para re-ensayo.

Fabricación de vector de pre-trabajo como materia prima

40 Se descongeló un único vial de células HEK 293 y se expandió en DMEM más glutamina que contenía un 10 % de FBS para generar, tras 5 pasajes, 2 botellas giratorias Cellbind de células adherentes dispersas uniformemente. El día de la infección, las células de una botella giratoria se suspendieron utilizando tripsina recombinante y se contaron. La densidad celular era de $1,06 \times 10^5$ células/cm². Las células en la segunda botella giratoria se infectaron con la materia prima de virus primario con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,64 ufp/célula en un inóculo de 113 ml. La cantidad necesaria de materia prima de virus (1,25 ml) se descongeló en hielo húmedo y se diluyó hasta 115 ml con medio de cultivo celular, (DMEM más glutamina y un 2 % de FBS).

45 Las botellas giratorias se giraron manualmente una vez y luego se colocaron en un banco de giro que rotaba a 0,1

rpm, en un equipo de incubación a 37 °C, durante 48 horas. Las botellas giratorias se comprobaron diariamente en cuanto a la presencia de CPE. El CPE típico se acompaña por redondeamiento de células. Los cultivos celulares de control se comprobaron en cuanto a la ausencia de CPE.

Las botellas giratorias infectadas con virus se recolectaron tras una única ronda de replicación vírica y con apariencia de CPE total (48 horas). Las células infectadas por el virus se resuspendieron suavemente en el medio de cultivo para formar una suspensión celular que se aglomeró entonces por centrifugación durante 15 minutos a 2000 rpm a 20 °C. El sobrenadante se retiró y el aglomerado celular se re-suspendió en 8,0 ml de tampón de lisis celular (10 mM de Tris, 135 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, pH 7,9 preparado en agua purificada CBF). El aglomerado celular se transfirió entonces a un tubo de polipropileno de 50 ml. El aglomerado celular se sometió a tres rondas de congelación descongelación (congelado en un baño de CO₂ seco/IPA y luego se descongeló en un baño de agua a 37 °C). El lisado celular se clarificó por centrifugación adicional a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante (lisado celular) se congeló instantáneamente a -80 °C en pequeñas alícuotas. Se tomó una muestra del lisado celular para el título de infección (3,34 x 10⁸ ufp/ml). Las muestras de sobrenadante celular infectado y no infectado (ambos de 100 ml) se analizaron en cuanto a biocarga (siendo ambos negativos).

15 **Fabricación de vectores de trabajo (WVS) 1 y 2 como materia prima**

Se utilizó la materia prima de vector de pre-trabajo (pre-WVS) para fabricar la materia prima de vector de trabajo (WVS1) y se utilizó el WVS1 para fabricar el WVS2. Ambos se implicaron en una única ronda de replicación vírica en células HEK 293 adherentes uniformemente en las botellas giratorias Cellbind. El tamaño del WVS se calculó de manera que un lote de producción discontinua utiliza < 10 % del WVS2 total. Para el WVS1, se utilizaron 14 botellas giratorias de células HEK 293 con una densidad celular de 1,29 x 10⁵/cm² para la expansión vírica y para WVS2, se utilizaron 29 botellas giratorias con una densidad celular de 1,54 x 10⁵/cm². La especificación de fabricación para ambos WVS1 y WVS2 era la misma. El inóculo vírico (pre-WVS o WVS1 respectivamente) se diluyó con DMEM más glutamina y un 2 % de FBS hasta 113 ml/botella giratoria para WVS1 y hasta 20 ml/botella giratoria durante 2 horas y luego hasta 113 ml/botella giratoria final para WVS2. Los MOI finales eran 1,01 para WVS1 y 8,6 ufp/célula para WVS2, respectivamente). Las botellas se giraron una vez manualmente y luego se colocaron en un banco de giro a 0,1 rpm, a 37 °C durante 48 y 71 horas, respectivamente. Las botellas giratorias se comprobaron diariamente en cuanto a la presencia de CPE. Se incluyó en ambos procedimientos una botella giratoria de control negativo que contenía células HEK 293 sin infectar para compararla y para el recuento de las células.

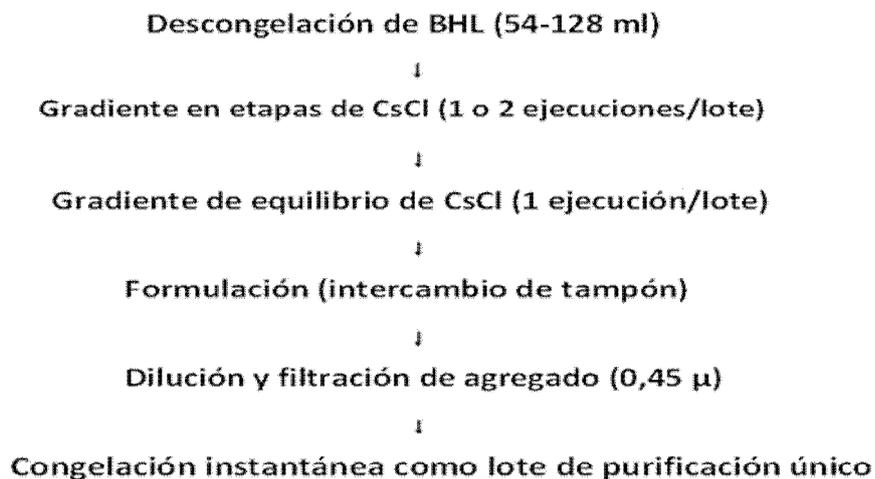
Los WVS1 se recolectaron 48 horas post-infección mientras que los WVS2 se recolectaron a las 71 post-infección. Las células infectadas con virus se resuspendieron suavemente en el sobrenadante celular para formar una suspensión celular que entonces se decantó en tubos de centrifuga y se aglomeraron por centrifugación durante 15 minutos a 2000 rpm a 20 °C. Los sobrenadantes celulares se retiraron y cada aglomerado celular se re-suspendió en 8,0 ml de tampón de lisis celular (10 mM de Tris, 135 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, pH 7,9) por botella giratoria. Las suspensiones de aglomerado celular se agruparon entonces en tubos de polipropileno. Los tubos se sometieron a tres rondas de congelación descongelación (congelados en un baño de IPA/ CO₂ seco y luego se descongelaron en un baño de agua a 37 °C). El lisado celular resultante se clarificó por una centrifugación adicional a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante (del lisado celular) que contenía los virus (WVS1 o WVS2) se agrupó, se muestreó, se repartió en alícuotas y se congeló instantáneamente a -80 °C. Se prepararon volúmenes finales de 112 ml y 236 ml de cada materia prima.

40 **Fabricación del lote clínico de recolección en masa de AdCh63 ME.TRAP**

Se utilizó el WVS2 para fabricar los tres lotes de recolección en masa de AdCh63 ME.TRAP. Cada lote consistía en una única ronda de replicación vírica de WVS2. El procedimiento era similar a la fabricación de WVS2 que se ha descrito anteriormente con una inoculación inicial de 20 ml/botella giratoria durante 2 horas seguida por un rellenado hasta un volumen final de 113 ml/botella giratoria pero tenía la adición de Benzonasa tras el primer ciclo de congelación/descongelación durante la lisis celular. El inóculo vírico (WVS2) se diluyó con DMEM que contenía un 2 % de FBS y glutamina como se ha descrito previamente y se añadió a las botellas giratorias de HEK 293 en 20 ml (con una MOI de 2-3 ufp/célula). Las botellas se giraron una vez manualmente y luego se colocaron en un banco de giro que rotaba a 0,1 rpm, en una incubadora a 37 °C durante un total de 71 horas. Las botellas giratorias se comprobaban diariamente en cuanto a la presencia de CPE y las botellas giratorias infectadas con virus se recolectaron tras la apariencia de CPE total. Las células infectadas con virus se re-suspendieron suavemente en el medio de cultivo para formar una suspensión celular. Una muestra de 2,5 ml de la suspensión celular y el sobrenadante se retiró de cada botella giratoria y se agruparon. Se marcó como lote 1, 2, o 3 del pre-agrupamiento de recolección en masa. Estas muestras de 'recolección en masa' se tomaron por un agrupamiento final para generar la muestra de recolección en masa para un proceso de ensayo externo de virus adventicios y para transcriptasa inversa. La suspensión restante se aglomeró entonces por centrifugación durante 30 minutos a 2000 rpm a 20 °C. Los sobrenadantes se eliminaron y cada aglomerado celular se re-suspendió en 8,0 ml de tampón de lisis celular (10 mM Tris, 135 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, pH 7,9). Las suspensiones de aglomerados celulares se agruparon entonces y se dispensaron en tubos de polipropileno. Los tubos se sometieron a una ronda de congelación descongelación (congelados en un baño de IPA/ CO₂ seco y luego se descongelaron en un baño de agua a 37 °C). El tiempo mínimo de congelación era de 30 min. Se añadió entonces la Benzonasa para degradar el ADN residual de las células huésped antes de la purificación (1500 unidades por 8 ml de lisado celular). El lisado

celular se incubó con Benzonasa durante 25-35 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un equipo gyro rocker a máxima velocidad tras lo cual tuvieron lugar dos rondas adicionales de congelación descongelación como se ha descrito previamente. El lisado celular se clarificó por una centrifugación adicional a 3000 rpm durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante del lisado celular se retiró utilizando una pipeta estéril para medir el volumen agrupado, se repartió en 5 alícuotas y se congeló instantáneamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Procesamiento corriente abajo para preparar el lote de recolección purificado



Las partículas de adenovirus tienen una densidad distinta en cloruro de cesio (CsCl) que permite su purificación de la mayoría de contaminantes víricos y proteínas y ADN de las células huésped por ultracentrifugación en gradiente de densidad en una centrifuga Optima ultra Beckman. Las partículas víricas que carecen de ADN empaquetado (cápsidas vacías) se pueden separar de los viriones completos ya que tienen una densidad más baja. Normalmente, después de una ultra-centrifugación en etapas se ve una banda inferior de partículas víricas infecciosas con una banda por encima que contiene las cápsidas vacías. La recolección del primer gradiente en etapas se purifica adicionalmente por una ultracentrifugación de equilibrio de CsCl durante 20 h. El tamaño del lote de purificación estaba limitado por el volumen de la recolección en masa que podían albergar los tubos de centrifuga y el rotor (Beckman SW40). El tamaño de las alícuotas de la recolección en masa se escogió de tal manera que el volumen era adecuado para transferirlo a este proceso y se descongeló el volumen de recolección en masa adecuado, al principio de cada lote de purificación. La recolección de virus de la etapa preliminar 1 y 2 de las ejecuciones de centrifugación en gradiente en etapas se utilizó como el material de partida para la segunda etapa de centrifugación en equilibrio. Por lo tanto, la purificación de los lotes de recolección en masa se llevó a cabo en una serie de procesos higiénicos repetitivos. En total, se prepararon un lote inicial pequeño (para los estudios de toxicidad y estabilidad) y 10 lotes de purificación a partir de los tres lotes de recolección en bruto.

Ultracentrifugación discontinua en CsCl

Se preparó manualmente un gradiente en etapas en tubos de centrifuga de 14 ml Ultraclear (Beckman) utilizando 3 densidades diferentes de CsCl. Las soluciones de cloruro de cesio se prepararon en 10 mM de Tris pH 7,9 en agua CBF purificada. Inicialmente se añadieron 2 ml de solución de 1,25 g/l de CsCl a cada tubo y se puso una capa por debajo de 2 ml de 1,35 g/l de CsCl. Finalmente, la solución de mayor densidad de CsCl (0,5 ml de 1,50 CsCl) se puso por debajo. Los gradientes se prepararon utilizando soluciones enfriadas en 1 hora de uso.

Las muestras individuales del lote de recolección en masa del lisado celular se descongelaron en agua fría ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Aproximadamente 8,5 ml del lisado celular se colocaron manualmente por encima del gradiente de CsCl. Los tubos se centrifugaron inmediatamente (< 1 hora) a 180.000 g durante 3 horas. Se separaron un área superior de residuos celulares, una banda difusa de material de cápsidas vacías y una banda inferior nítida de virus infecciosos durante la centrifugación. La banda inferior se recolectó perforando el lado de cada tubo con una aguja horizontal de 16 G acoplada a una jeringa de 1 ml. Se recolectó una media de 0,6 ml de virus por tubo y se agruparon y se almacenaron si era necesario a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. El máximo tiempo de mantenimiento era de 4 horas.

Ultracentrifugación de equilibrio en CsCl

Se utilizaron tubos de centrifuga idénticos para llevar a cabo la ultracentrifugación de equilibrio. Inicialmente se llenaron con 6 ml de un CsCl con una densidad de 1,35 y se recubrieron con 1,0 – 1,5 ml del agrupamiento vírico recolectado de las primeras etapas de ultracentrifugación. El tampón de relleno era solución salina tampón fosfato preparado en agua para inyección. El virus se centrifugó a 150.000 g durante 20 horas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esto daba como resultado una banda superior débil difusa y una banda nítida inferior de partículas víricas intactas. También se

podían ver dos bandas débiles a cada lado de la banda nítida. La banda nítida principal de partículas víricas infecciosas se recolectó utilizando una aguja horizontal de 16 G y una jeringa como anteriormente. Se recolectaron entre 0,5 y 1,0 ml de virus por tubo y se almacenaron a 4-10 °C en una caja fría durante un máximo de 2 horas antes de la formulación final por intercambio de tampón.

5 Formulación en el tampón final

El agrupamiento de virus purificado en CsCl se intercambió de tampón con un tampón de formulación final (A438) por medio de desalación cromatográfica en Sephadex G25 utilizando columnas desechables de polipropileno listas para el vertido PD-10 que contenían 8,3 ml de Sephadex G25 en agua que contenía un 0,15 % de Kathon como biocida (Amersham Biosciences division de GE Healthcare). Se establecieron condiciones de lavado con agua de 6 volúmenes de columna antes de la higienización que retiraban >99,5 % del Kathon del eluido de la columna.

Tras el lavado, las columnas se limpiaron durante un mínimo de 20 minutos con 0,5 M de hidróxido sódico y se utilizaron cinco volúmenes de columna de solución salina tampón fosfato para neutralizar el hidróxido sódico. Las columnas finalmente se lavaron en tampón de formulación: (3 volúmenes de columna). El tampón de formulación (A438): 20 mM histideno, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,1 mM EDTA, un 0,5 % (v/v) de etanol, un 7,5 % de sacarosa, un 0,1 % de PS80, pH 6,6 se preparó utilizando agua para inyección. Las condiciones se establecieron para que la muestra de virus (<1,5 ml) y los volúmenes de recolección (< 2,25 ml) dieran como resultado una concentración final de CsCl en la dosis máxima de producto final para el paciente de > 6 logs por debajo del peso ajustado equivalente a la DL50 de rata para la inyección subcutánea de cloruro de cesio. Se utilizaron una serie de columnas (≤ 5) para el intercambio de tampón de cada lote de purificación de forma que se podían aplicar los volúmenes especificados y se recolectaron. Los picos de virus se recolectaron como una fracción única de cada columna y las fracciones se agruparon para generar un lote de purificación concentrado. A partir de la determinación de partículas víricas QC, se diluyó el lote con A438 enfriado en hielo hasta entre 2-3 x 10¹¹ pv/ml y se filtró a través de un filtro de 0,45 micras (un filtro en forma de disco de 33 mm de diámetro Millipore Millex HV) para retirar los grandes agregados víricos. Cada lote de purificación se congeló instantáneamente en alcohol isopropílico/hielo seco y se almacenó a -80 °C. El tiempo de mantenimiento máximo era de 1 hora tras la formulación.

La forma final de dosificación se presentó en viales de cristal de 0,6 ml. Cada vial de AdCh63 ME.TRAP contenía 1,3 x 10¹¹ pv/ml formuladas en 10 mM de Histidina, un 7,5 % de sacarosa, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, un 0,1 % de PS80, 0,1 mM de EDTA, un 0,5 % de etanol, pH 6,6 (Este título se determinó por la absorbancia a 260 nm). La dosis de AdCh63 ME.TRAP que se va a utilizar normalmente es entre 1 x 10⁸ pv y 5 x 10¹⁰ pv por administración intradérmica. El volumen administrado se puede alterar, correspondiendo con cualquier concentración actualizada.

Ejemplo 2 . Ensayo del vector AdCh63 ME.TRAP

Materiales y procedimientos

Inmunización de ratones

Se adquirieron ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad en Biomedical Services Unit en el Hospital John Radcliffe, Oxford, todos los animales de acuerdo con el cumplimiento de los términos de la U.K. Home Office Animals Act Project License. Se llevaron a cabo las inmunizaciones por vía intradérmica, que había demostrado anteriormente que daba lugar a una mejor inmunogenicidad en comparación con otras vías, por ejemplo subcutánea, intramuscular [11]. Los adenovirus se administraron a una dosis de 1 x 10¹⁰ partículas víricas (pv) para los experimentos que implicaban una única sensibilización y dosis menores de 5 x 10⁹ para los protocolos sensibilización-refuerzo. Se utilizó el MVA a una dosis de 1 x 10⁷ ufp para el refuerzo de respuestas de linfocitos T. Todos los vectores se re-suspendieron en PBS libre de toxinas antes de la inmunización.

Inmunización y análisis de las respuestas de linfocitos T en macacos

Los macacos Rhesus, se inmunizaron por dos vías diferentes, por inyección intramuscular en los músculos deltoides (número de id de macaco: 0033, 1029, 2013 y 4073) y administración intradérmica (número id: 0043, 2009 y 6015) de AdCh63 ME.TRAP a una dosis de 5 x 10¹⁰ p.v. Todos los macacos recibieron un refuerzo por inmunización intradérmica 8 semanas más tarde con MVA ME.TRAP a una dosis de 2 x 10⁸ ufp.

Se llevó a cabo un IFN γ ELISpot *ex vivo* estimulando los linfocitos T con 4 agrupamientos peptídicos que abarcaban toda la región ME.TRAP. Las respuestas totales a TRAP se calcularon sumando las respuestas de los agrupamientos individuales y restando el valor de fondo de muestras no estimuladas que solo contenían DMSO.

50 Vectores víricos

Todos los vectores víricos que se utilizaron en los experimentos, AdCh63, AdC9 y MVA, expresaban el transgén ME.TRAP que se había descrito anteriormente [5, 12]. Como se ha descrito en otra parte del presente documento, la inserción ME.TRAP es un transgén híbrido de 2398 pb que codifica una proteína de 789 aminoácidos. La cadena ME contiene el epítipo Pb9 de BALB/c H-2Kd entre otros varios epítipos de linfocito B y T [13]. El vector adenoviral de simio AdC9 (SAdV) se construyó y propagó como se ha descrito anteriormente [14].

La fabricación y producción de vectores para AdCh63 ME.TRAP se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1. El AdCh63 se había producido satisfactoriamente con buenos títulos utilizando este protocolo y se puede utilizar un protocolo similar para producir vectores ME.TRAP basados en estructuras de vector adenoviral de simio alternativas.

5 IFN γ ELISpot *ex vivo*

Los esplenocitos o PBMC tratados con ACK se cultivaron durante 18-20 horas en placas de membrana IPVH (Millipore) con el epítipo Pb9 restringido a H-2Kd inmunodominante (SYIPSAEKI) con una concentración final de 1 mg/ml. Se llevó a cabo la ELISPOT como se había descrito previamente [15].

ELISA

10 Los anticuerpos contra la región TRAP se analizaron por ELISA como se ha descrito previamente [16]. Para este experimento se obtuvo suero de los grupos de al menos de 3 ratones BALB/c tras 4 semanas de inmunización con regímenes de sensibilización-refuerzo con adenovirus-MVA.

Desafío con el parásito

15 Se aislaron esporozoítos (spz) de *Plasmodium berghei* (cepa ANKA clon 234) a partir de las glándulas salivares de mosquitos hembras de *Anopheles stephensi*. Los parásitos se re-suspendieron en medio RPMI-1640 recibiendo cada ratón un total de 1.000 spz mediante vía i.v. Las muestras de sangre se recogieron diariamente desde el día 5 al 20; los frotis se tiñeron con Giemsa y se exploró la presencia de esquizontes en los glóbulos rojos de la sangre. La supervivencia se definió como la ausencia completa de parásitos en la sangre.

Análisis estadístico

20 La significación estadística de muestras de citometría de flujo se analizó con un ANOVA de una o dos vías y un post-ensayo de Bonferroni. Todos los ensayos estadísticos se llevaron a cabo utilizando la versión 4.03 de GraphPad Prism para Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA, www.graphpad.com.

RESULTADOS

Inmunogenicidad con una única sensibilización de AdCh63ME.TRAP en ratones

25 Con una única inmunización, los vectores adenovirales eran capaces de inducir fuertes respuestas a largo plazo de linfocitos T CD8+. La Figura 2 muestra una comparación entre AdCh63 y AdC9 que codifican ambos el transgén ME.TRAP. La presencia del epítipo Pb9 restringido a H-2Kd inmunodominante (SYIPSAEKI) en la cadena ME del transgén permite a los inventores evaluar la potencia de la respuesta inmunitaria producida por los vectores víricos. Los resultados en el laboratorio de los inventores han demostrado que el AdC9 es uno de los vectores más
30 inmunogénicos y es capaz de inducir respuestas de linfocitos T CD8+ que superan al serotipo humano AdH5. La Figura 2 muestra que el AdCh63ME.TRAP induce respuestas similares al AdC9 durante un periodo de tiempo de 60 días. Las respuestas CD8 a AdCh63 eran significativamente más altas que las de AdC9 muy pronto tras 7 días de vacunación y no se encontraron diferencias significativas después. Un objetivo importante de cualquier vacuna vectorial vírica es la posibilidad de inducir fuertes respuesta de linfocitos T CD8+ de memoria y a este aspecto,
35 ambos vectores, AdC9 y AdCh63 ME.TRAP mostraban una inmunogenicidad similar incluso tras un largo periodo de tiempo de 60 días.

Protección a un desafío con *Plasmodium berghei* en ratones

Los resultados de este estudio han demostrado por primera vez que una única vacunación con vectores adenovirales pueden producir altos niveles de protección estéril a la malaria en un desafío con esporozoítos de *P.*
40 *berghei*. Los experimentos iniciales han demostrado que los vectores tales como AdH5, AdC7 y AdC9 son capaces de proteger un alto porcentaje de ratones tras solamente una vacunación (a una dosis de 1×10^{10} pv). La Figura 3 muestra una comparación de niveles protectores de AdCh63 ME.TRAP con AdC9 poco después de la inmunización el día 14 (a) y tras un largo periodo de tiempo de 60 días (b) entre la administración de la vacuna y el desafío. A pesar de la inmunogenicidad similar de ambos vectores en el tiempo (Fig. 2), los niveles de protección producidos por AdCh63 ME.TRAP superaban los de AdC9 en ambos puntos de tiempo. Tiene particular importancia, que los inventores descubrieron que con un desafío el día 14 post-vacunación, el AdCh63 protegía todos los ratones contra la infección durante 15 días y al final del experimento solo un ratón de 6 estaba infectado. El AdC9 presentaba niveles más bajos de protección en el corto (Fig. 3a) y largo (Fig. 3b) plazo.

Regímenes de sensibilización-refuerzo

50 Se ha expuesto que la sensibilización con AdH5 seguido por un refuerzo con MVA (regímenes A-M) que codificaban el mismo transgén, aumenta la inmunogenicidad cuando se compara con la administración única de un vector o regímenes de sensibilización-refuerzo con otros vectores tales como ADN o FP9 seguido por MVA [11]. Los inventores por lo tanto han ensayado una estrategia que utiliza regímenes de sensibilización-refuerzo combinando un vector adenoviral de simio seguido 8 semanas más tarde por el vector MVA poxvírico. La Figura 4 muestra una

comparación entre las respuestas de linfocitos T CD8+ (Fig. 4a, b) y las respuestas de anticuerpo producidas por regímenes de AdCh63-MVA y AdC9-MVA. Poco después de la inmunización (Fig. 4a), el AdCh63 presentaba altos niveles de respuestas CD8 y aunque las respuestas de AdC9 eran más potentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El análisis de las respuestas a largo plazo presentaba la gran ventaja de un régimen de sensibilización-refuerzo sobre una única sensibilización. Como se muestra en la Figura 4b, las respuestas de CD8 se mantenían altas incluso el día 60 tras el refuerzo (> 25.000 SFC/millón de PBMC, Fig. 2). Seis meses después de un refuerzo con MVA, los niveles de inmunogenicidad se mantienen aún por encima de 10.000 puntos/millón de PBMC y no se encontraron diferencias significativas entre los dos vectores adenovirales de simio ensayados.

Aunque la eficacia de protección descansa en las respuestas inmunitarias celulares en este sistema, los vectores adenovirales ofrecen la ventaja adicional de inducir fuertes respuestas de anticuerpo específicas del transgén [17]. Esta característica es potencialmente importante cuando se utilizan los vectores adenovirales con fines vacunales en seres humanos debido a la protección extra que proporcionan los anticuerpos además de las respuestas inmunitarias celulares. Las repuestas humorales se evaluaron cuantificando la IgG producida por regímenes de sensibilización-refuerzo A-M. Como se muestra en la Figura 4c, las respuestas de anticuerpo eran altas con los dos regímenes ensayados y el uso de una combinación AdCh63-MVA daba como resultado niveles de IgG significativamente más altos en comparación con AdC9.

Como los niveles de inmunogenicidad mejoraban con los regímenes de sensibilización-refuerzo, los niveles de protección estéril se analizaron utilizando la misma estrategia de vacunación secuencial (Fig. 5). Se encontraron niveles superiores en intervalos cortos y largos tras el refuerzo en ambos regímenes. Sin embargo, el régimen ADCh63-MVA superaba el AdC9-MVA en todos los puntos de tiempo ensayados. Es interesante que el régimen AdCh63-MVA produjera una protección estéril en el 100 % de los animales a corto plazo. A pesar de que la protección disminuye con el tiempo, permanecía alta y sorprendentemente ambos regímenes inducían niveles superiores de protección incluso seis meses después de la vacunación con el refuerzo (Fig. 5c).

25 Inmunogenicidad en macacos Rhesus

En muchos ejemplos de la técnica anterior, se observó que la eficacia de las vacunas vectoriales disminuía cuando se ensayaban en primates no humanos y seres humanos, en comparación con las respuestas en ratones. Por lo tanto, se ensayó un régimen similar de sensibilización-refuerzo similar al descrito anteriormente en macacos Rhesus.

Se inmunizaron siete macacos Rhesus con una dosis de 5×10^{10} pv de AdCh63 ME.TRAP preparada de acuerdo con el Ejemplo 1. La vacuna se administró tanto intradérmica como intramuscularmente, pero como no se observaron diferencias en cuanto a la inmunogenicidad entre las vías, los datos se muestran combinados. En varios momentos tras la inmunización con AdCh63 ME.TRAP se administraron inmunizaciones de refuerzo con un vector vírico heterólogo, MVA que codifica ME.TRAP (véase la Figura 7). Los datos mostraban (Figura 8) que AdCh63 ME.TRAP era altamente inmunogénico en monos macacos, una especie que se considera ampliamente como útilmente predictiva de la inmunogenicidad vacunal en seres humanos. Tras una única inmunización se observó que la media de respuestas de linfocitos T era de aproximadamente 1000 SFU por millón de PBMC en los ensayos ELISpot, un nivel asociado previamente con la protección en seres humanos para esta inserción vacunal (Webster y col. PNAS 2005 102:4836-41). También se inducían fuertes títulos de anticuerpos por la vacunación. Las inmunizaciones de refuerzo heterólogas con MVA podían reforzar tanto las respuestas de linfocitos T como de anticuerpos con niveles incluso más altos. El análisis limitado al fenotipo de linfocitos T de los puntos de tiempo seleccionados mostraban que se inducían tanto linfocitos T CD8 como CD4 por los regímenes de vacunación y que estos podían ser células polifuncionales que expresaban el interferón gamma, TNF e IL2.

Como se muestra en la Figura 6a, la sensibilización con AdCh63 ME.TRAP producía respuestas de linfocitos T robustas que tenían un pico la semana 4 tras la vacunación. Es interesante que todos los macacos excepto uno (4073) eran juveniles que pesaban entre 3-4 kg, mientras que el animal mayor y más pesado nº 4073 (más de 10 kg) mostraba repuestas inmunitarias excepcionalmente buenas en la sensibilización. Es importante, que las respuestas de linfocitos T podían reforzarse con una vacunación posterior con MVA ME.TRAP y se encontraron diferencias de hasta cinco veces en algunos casos cuando se comparaba el pico de una sensibilización frente al pico tras un refuerzo. Se hicieron observaciones adicionales tras comparar las respuestas inmunitarias contra los agrupamientos peptídicos que abarcan la región ME.TRAP completa. Las respuestas de linfocitos T se enfocaron principalmente al agrupamiento T2 tras la sensibilización con AdCh63 (Figura 6b). Sin embargo, el refuerzo con MVA daba la ventaja adicional de un aumento de anchura de la respuesta inmunitaria a ME.TRAP, donde el foco principal era no solo a T2 sino también hacia la secuencia ME.TRAP completa (Figura 6c). De manera importante, estas fuertes respuestas de linfocitos T inducidas en los macacos eran probablemente las más fuertes que se hayan inducido jamás contra un antígeno de malaria y eran mucho más altas que las respuestas de linfocitos T inducidas contra ME.TRAP por cualquier ensayo clínico realizado hasta la fecha. Debido a que la magnitud de respuestas de linfocitos T inducidas contra TRAP se correlacionaba con la cantidad de protección medida en ensayos clínicos humanos (Webster y col. PNAS; Dunachie y col Infection and Immunity) los inventores anticiparon que este régimen vacunal debería ser más eficaz que cualquier vacuna ME.TRAP ensayada hasta la fecha en seres humanos.

Uso de AdCh63 ME.TRAP en seres humanos

El vector adenoviral de simio AdCh63 ME.TRAP se ha evaluado en un ensayo clínico en fase I con seres humanos para ensayar la seguridad e inmunogenicidad en seres humanos por una única inmunización con AdCh63 ME.TRAP en un régimen de sensibilización-refuerzo que implica el adenovirus previo seguido por un refuerzo con MVA 8 semanas más tarde.

Todos los voluntarios reclutados eran varones adultos sanos. Como era la primera vez que se evaluaba un vector de adenovirus de chimpancé en seres humanos el primer grupo de vacunados recibió una dosis de vacuna muy baja, 10^8 pv. Esto se podía contrastar con la dosis de 5×10^{10} pv administrada a macacos y $1-10 \times 10^{10}$ pv que se utilizó como una dosis normal en ensayos vacunales previos de vectores de adenovirus humanos. A esta dosis baja de 10^8 pv tanto la seguridad local como sistémica en los ocho primeros voluntarios era excelente. Cuatro de estos individuos recibieron una inmunización de refuerzo con MVA que codificaba ME.TRAP a una dosis de 2×10^8 ufp. El curso en el tiempo de la inmunogenicidad de linfocitos T en estos cuatro voluntarios, se muestra, como una media de la respuesta en la Figura 9. La inmunogenicidad se midió por ELISpot de interferón gamma *ex vivo* de agrupamientos de péptidos 15meros que solapan la inserción vacunal: T9/96 TRAP 15mero, y también con la misma secuencia que solapa 20meros peptídicos: T9/96 TRAP 20mero. También se muestra la respuestas de péptidos 10meros que representan una cepa heteróloga de *P. falciparum*: 3 D7 20mero TRAP. Finalmente, la respuesta contra la cadena corta de epitopos peptídicos de malaria principalmente nonámeros en la cadena ME poliepítipo (Gilbert y col. Nature Biotechnol. 1997 Nov;15:1280-4) se muestra: ME.

Estos resultados muestran que incluso utilizando una dosificación muy baja se observaban respuestas de linfocitos T contra TRAP a las cuatro semanas tras una inmunización única con AdCh63 ME.TRAP en seres humanos. Adicionalmente, estas respuestas se pueden reforzar fuertemente por la vacuna MVA indicando que se sensibilizan linfocitos T de memoria en seres humanos por el vector adenoviral.

REFERENCIAS

- 1 Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. y Hay, S. I., The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 2005. 434: 214-217.
- 2 Hill, A. V., Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. Nat Rev Immunol 2006. 6: 21-32.
- 3 Tsuji, M. y Zavala, F., T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. Trends Parasitol 2003. 19: 88-93.
- 4 Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R. L. y Hoffman, S. L., Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. Science 1991. 252: 715-718.
- 5 Gilbert, S. C., Plebanski, M., Harris, S. J., Allsopp, C. E., Thomas, R., Layton, G. T. y Hill, A. V., A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes. Nat Biotechnol 1997. 15: 1280-1284.
- 6 Moorthy, V. S., McConkey, S., Roberts, M., Gothard, P., Arulanantham, N., Degano, P., Schneider, J., Hannan, C., Roy, M., Gilbert, S. C., Peto, T. E. y Hill, A. V., Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers. Vaccine 2003. 21: 1995-2002.
- 7 Rodrigues, E. G., Zavala, F., Eichinger, D., Wilson, J. M. y Tsuji, M., Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. J Immunol 1997. 158: 1268-1274.
- 8 Zhi, Y., Figueredo, J., Kobinger, G. P., Hagan, H., Calcedo, R., Miller, J. R., Gao, G. y Wilson, J. M., Efficacy of Severe Acute Respiratory Syndrome Vaccine Based on a Nonhuman Primate Adenovirus in the Presence of Immunity Against Human Adenovirus. Hum Gene Ther 2006.
- 9 Fitzgerald, J. C., Gao, G. P., Reyes-Sandoval, A., Pavlakis, G. N., Xiang, Z. Q., Wlazlo, A. P., Giles-Davis, W., Wilson, J. M. y Ertl, H. C., A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. J Immunol 2003. 170: 1416-1422.
- 10 Reyes-Sandoval, A., Fitzgerald, J. C., Grant, R., Roy, S., Xiang, Z. Q., Li, Y., Gao, G. P., Wilson, J. M. y Ertl, H. C., Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. J Virol 2004. 78: 7392-7399.
- 11 Gilbert, S. C., Schneider, J., Hannan, C. M., Hu, J. T., Plebanski, M., Sinden, R. y Hill, A. V., Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. Vaccine 2002. 20: 1039-1045.
- 12 McConkey, S. J., Reece, W. H., Moorthy, V. S., Webster, D., Dunachie, S., Butcher, G., Vuola, J. M., Blanchard, T. J., Gothard, P., Watkins, K., Hannan, C. M., Everaere, S., Brown, K., Kester, K. E., Cummings, J., Williams, J., Heppner, D. G., Pathan, A., Flanagan, K., Arulanantham, N., Roberts, M. T., Roy, M., Smith, G. L., Schneider, J., Peto, T., Sinden, R. E., Gilbert, S. C. y Hill, A. V., Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. Nat Med 2003. 9: 729-735.
- 13 Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L. y Hill, A. V., Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. Nat Med 1998. 4: 397-402.
- 14 Roy, S., Gao, G., Lu, Y., Zhou, X., Lock, M., Calcedo, R. y Wilson, J. M., Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. Hum Gene Ther 2004. 15: 519-530.
- 15 Moore, A. C., Gallimore, A., Draper, S. J., Watkins, K. R., Gilbert, S. C. y Hill, A. V., Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodom-

inance. J Immunol 2005. 175: 7264-7273.

16 Webster, D. P., Dunachie, S., Vuola, J. M., Berthoud, T., Keating, S., Laidlaw, S. M., McConkey, S. J., Poulton, I., Andrews, L., Andersen, R. F., Bejon, P., Butcher, G., Sinden, R., Skinner, M. A., Gilbert, S. C. y Hill, A. V., Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. Proc Natl Acad Sci U S A 2005. 102: 4836-4841.

5 17 Xiang, Z., Gao, G., Reyes-Sandoval, A., Cohen, C. J., Li, Y., Bergelson, J. M., Wilson, J. M. y Ertl, H. C., Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product. J Virol 2002. 76: 2667-2675.

10 18 Sacre, K., Carcelain, G., Cassoux, N., Fillet, A. M., Costagliola, D., Vittecoq, D., Salmon, D., Amoura, Z., Katlama, C. y Autran, B., Repertoire, diversity, and differentiation of specific CD8 T cells are associated with immune protection against human cytomegalovirus disease. J Exp Med 2005. 201: 1999-2010.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Isis Innovation Limited Okarios
- <120> Vector adenoviral que codifica un antígeno de malaria
- <130> P94531W000
- 20 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 2402
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Inserción en el vector que codifica el antígeno ME.TRAP
- <400> 1

ES 2 642 112 T3

gatccgcg ccaccatggg tatgatcaac gcctacttgg acaagttgat ctccaagtac 60
gaagacgaaa tctcctacat cccatctgcc gaaaagatcg gatctaagcc gaacgacaag 120
tccttgata aacctaaagga cgaattggac tacaagccaa tcggtcaata cgacaacttc 180
ggatctgcct ccaagaacaa ggaaaaggct ttgatcatcg gtatcgctgg tggtttggcc 240
ttgttgatga accctaata cccaaacaga aacgtcagat ctcacttggg taacgttaag 300
tacttggtta agtctttgta cgatgaacac atcttattga tggactgttc tggttctatt 360
ggatctgacc caaacgctaa cccaaacggt gacccaaaacg ccaaccocaaa cgtccaagtt 420
cacttccaac cattgcctcc ggcggtgtc aagttgcaat tcatcaaggc caactctaag 480
ttcatoggta tcaccgaagg atcttacttg aacaaaattc aaaactcttt gatggaaaag 540
ttgaaagaat tggaaaaggc tacttctgtc ttggctggtt tgggatctaa cgctaatacca 600
aacgcaaatc cgaacgcaa tcctaacgcg aatcccgacg aatggtctcc atgttctgtc 660
acttggtgta aggtactcg ctctagaaag agagaaggat ccaaaataat gaatcatctt 720
gggaatgta aatatttagt cattgtgttt ttgattttct ttgatttgtt tctagttaat 780
ggtagagatg tgcaaaacaa tatagtggat gaaataaaat atagtgaaga agtatgtaat 840
gatcaggtag atctttacct totaatggat tgttctggaa gtatacgtcg tcataattgg 900
gtgaaccatg cagtacctct agctatgaaa ttgatacaac aattaaatct taatgataat 960
gcaattcact tatatgtaa tgttttttca aacaatgcaa aagaaattat tagattacat 1020
agtgatgcat ctaaaaacaa agagaaggct ttaattatta taaggctact ctttaagtaca 1080
aatcttccat atggtagaac aaacttaact gatgcactgt tacaagtaag aaaacattta 1140
aatgaccgaa tcaatagaga gaatgctaata caattagttg ttatattaac agatggaatt 1200
ccagatagta ttcaagattc attaaaagaa tcaagaaaat taagtgatcg tgggtgtaaa 1260
atagctgttt ttggtattgg acaaggtatt aatgtagctt tcaacagatt tottgtaggt 1320

ES 2 642 112 T3

tgtcatccat cagatggtaa atgtaacttg tatgctgatt ctgcatggga aatgtaaaa 1380
 aatgttatcg gaccctttat gaaggctggt tgtgttgaag tagaaaaaac agcaagttgt 1440
 ggtgtttggg acgaatggtc tccatgtagt gtaacttgtg gtaaaggtag caggtcaaga 1500
 aaaagagaaa tcttacacga aggatgtaca agtgaaatac aagaacaatg tgaagaagaa 1560
 agatgtcctc caaatggga accattagat gttccagatg aaccogaaga tgatcaacct 1620
 agaccaagag gagataattc ttctgtccaa aaaccagaag aaaatataat agataataat 1680
 ccacaagaac cttcaccaa tccagaagaa gaaaggatg aaaatccaaa oggatttgat 1740
 ttagatgaaa atccagaaaa tccaccaaat ccagatattc ctgaacaaaa accaaatata 1800
 cctgaagatt cagaaaaaga agtaccttct gatgttccaa aaaatccaga agacgatcga 1860
 gaagaaaact ttgatattcc aaagaaacct gaaaataagc acgataatca aaataattta 1920
 ccaaatgata aaagtgatag aaatattcca tattcaccat tacctccaaa agttttggat 1980
 aatgaaagga acaaagtga cccccaagt caagataata atggaaatag gcacgtacct 2040
 aatagtgaag atagagaaac acgtccacat ggtagaaata atgaaatag atcatacaat 2100
 agaaaatata acgatactcc aaaacatcct gaaaggaag aacatgaaaa gccagataat 2160
 aataaaaaaa aaggagaatc agataataaa tataaaattg caggtggaat agctggagga 2220
 ttagctttac tcgcatgtgc tggacttgct tataaattcg tagtaccagg agcagcaaca 2280
 ccctatgccg gagaacctgc accttttgat gaaacattag gtgaagaaga taaagatttg 2340
 gacgaacctg aacaattcag attacctgaa gaaaacgagt ggaattaaat ataatacgga 2400
 tc 2402

<210> 2
 <211> 790
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Antígeno ME.TRAP

10

<400> 2

ES 2 642 112 T3

Met Gly Met Ile Asn Ala Tyr Leu Asp Lys Leu Ile Ser Lys Tyr Glu
1 5 10 15

Asp Glu Ile Ser Tyr Ile Pro Ser Ala Glu Lys Ile Gly Ser Lys Pro
20 25 30

Asn Asp Lys Ser Leu Tyr Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Lys Pro
35 40 45

Ile Val Gln Tyr Asp Asn Phe Gly Ser Ala Ser Lys Asn Lys Glu Lys
50 55 60

ES 2 642 112 T3

Ala Leu Ile Ile Gly Ile Ala Gly Gly Leu Ala Leu Leu Met Asn Pro
65 70 75 80

Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Arg Ser His Leu Gly Asn Val Lys Tyr
85 90 95

Leu Val Lys Ser Leu Tyr Asp Glu His Ile Leu Leu Met Asp Cys Ser
100 105 110

Gly Ser Ile Gly Ser Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn
115 120 125

Ala Asn Pro Asn Val Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val
130 135 140

Val Lys Leu Gln Phe Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
145 150 155 160

Glu Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Met Glu Lys Leu
165 170 175

Lys Glu Leu Glu Lys Ala Thr Ser Val Leu Ala Gly Leu Gly Ser Asn
180 185 190

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asp
195 200 205

Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Lys Gly Thr Arg Ser Arg
210 215 220

Lys Arg Glu Gly Ser Lys Ile Met Asn His Leu Gly Asn Val Lys Tyr
225 230 235 240

Leu Val Ile Val Phe Leu Ile Phe Phe Asp Leu Phe Leu Val Asn Gly
245 250 255

Arg Asp Val Gln Asn Asn Ile Val Asp Glu Ile Lys Tyr Ser Glu Glu
260 265 270

Val Cys Asn Asp Gln Val Asp Leu Tyr Leu Leu Met Asp Cys Ser Gly
275 280 285

Ser Ile Arg Arg His Asn Trp Val Asn His Ala Val Pro Leu Ala Met
290 295 300

Lys Leu Ile Gln Gln Leu Asn Leu Asn Asp Asn Ala Ile His Leu Tyr
305 310 315 320

ES 2 642 112 T3

Val Asn Val Phe Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ile Ile Arg Leu His Ser
 325 330 335

Asp Ala Ser Lys Asn Lys Glu Lys Ala Leu Ile Ile Ile Arg Ser Leu
 340 345 350

Leu Ser Thr Asn Leu Pro Tyr Gly Arg Thr Asn Leu Thr Asp Ala Leu
 355 360 365

Leu Gln Val Arg Lys His Leu Asn Asp Arg Ile Asn Arg Glu Asn Ala
 370 375 380

Asn Gln Leu Val Val Ile Leu Thr Asp Gly Ile Pro Asp Ser Ile Gln
 385 390 395 400

Asp Ser Leu Lys Glu Ser Arg Lys Leu Ser Asp Arg Gly Val Lys Ile
 405 410 415

Ala Val Phe Gly Ile Gly Gln Gly Ile Asn Val Ala Phe Asn Arg Phe
 420 425 430

Leu Val Gly Cys His Pro Ser Asp Gly Lys Cys Asn Leu Tyr Ala Asp
 435 440 445

Ser Ala Trp Glu Asn Val Lys Asn Val Ile Gly Pro Phe Met Lys Ala
 450 455 460

Val Cys Val Glu Val Glu Lys Thr Ala Ser Cys Gly Val Trp Asp Glu
 465 470 475 480

Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Lys Gly Thr Arg Ser Arg Lys
 485 490 495

Arg Glu Ile Leu His Glu Gly Cys Thr Ser Glu Ile Gln Glu Gln Cys
 500 505 510

Glu Glu Glu Arg Cys Pro Pro Lys Trp Glu Pro Leu Asp Val Pro Asp
 515 520 525

Glu Pro Glu Asp Asp Gln Pro Arg Pro Arg Gly Asp Asn Ser Ser Val
 530 535 540

Gln Lys Pro Glu Glu Asn Ile Ile Asp Asn Asn Pro Gln Glu Pro Ser
 545 550 555 560

Pro Asn Pro Glu Glu Gly Lys Asp Glu Asn Pro Asn Gly Phe Asp Leu
 565 570 575

Asp Glu Asn Pro Glu Asn Pro Pro Asn Pro Asp Ile Pro Glu Gln Lys

ES 2 642 112 T3

			580					585					590			
Pro	Asn	Ile	Pro	Glu	Asp	Ser	Glu	Lys	Glu	Val	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	
		595					600					605				
Lys	Asn	Pro	Glu	Asp	Asp	Arg	Glu	Glu	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Lys	Lys	
	610					615					620					
Pro	Glu	Asn	Lys	His	Asp	Asn	Gln	Asn	Asn	Leu	Pro	Asn	Asp	Lys	Ser	
625					630					635					640	
Asp	Arg	Asn	Ile	Pro	Tyr	Ser	Pro	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Leu	Asp	Asn	
				645					650					655		
Glu	Arg	Lys	Gln	Ser	Asp	Pro	Gln	Ser	Gln	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Arg	
			660					665					670			
His	Val	Pro	Asn	Ser	Glu	Asp	Arg	Glu	Thr	Arg	Pro	His	Gly	Arg	Asn	
		675					680						685			
Asn	Glu	Asn	Arg	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Tyr	Asn	Asp	Thr	Pro	Lys	His	
	690					695					700					
Pro	Glu	Arg	Glu	Glu	His	Glu	Lys	Pro	Asp	Asn	Asn	Lys	Lys	Lys	Gly	
705					710					715					720	
Glu	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Lys	Ile	Ala	Gly	Gly	Ile	Ala	Gly	Gly	Leu	
				725					730					735		
Ala	Leu	Leu	Ala	Cys	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Lys	Phe	Val	Val	Pro	Gly	
			740					745					750			
Ala	Ala	Thr	Pro	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Ala	Pro	Phe	Asp	Glu	Thr	Leu	
		755					760					765				
Gly	Glu	Glu	Asp	Lys	Asp	Leu	Asp	Glu	Pro	Glu	Gln	Phe	Arg	Leu	Pro	
	770					775						780				
Glu	Glu	Asn	Glu	Trp	Asn											
785					790											

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma del adenovirus de simio en el que se ha integrado de forma estable un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocitos T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 de adenovirus de chimpancé (AdCh63).
- 10 2. Un vector de adenovirus de simio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antígeno comprende o consiste en ME.TRAP.
3. Un vector de adenovirus de simio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén comprenden un promotor CMV.
- 15 4. Un vector de adenovirus de simio de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las secuencias reguladoras comprenden el promotor del gen E1 de HCMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 de HCMV que incluye el intrón A.
5. Un vector de adenovirus de simio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un genoma de adenovirus de simio empaquetado en partículas víricas infecciosas.
- 20 6. Una composición inmunogénica que comprende el vector de adenovirus de simio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, mezclado con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables o una composición de vacuna que comprende el vector de adenovirus de simio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, mezclado con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 25 7. Un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha incorporado de forma estable un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocitos T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 de adenovirus de chimpancé (AdCh63) para su uso como una vacuna.
- 30 8. Uso de un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha integrado de forma estable un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocitos T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 de adenovirus de chimpancé (AdCh63) en la fabricación de un medicamento para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria contra la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP) en un sujeto humano.
- 35 9. Uso de un vector de adenovirus de simio recombinante deficiente en replicación que comprende un genoma de adenovirus de simio en el que se ha integrado de forma estable un transgén, que codifica al menos un antígeno, unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del transgén en células de mamífero, en el que el antígeno comprende una proteína de adhesión relacionada con la trombospondina de *Plasmodium* (TRAP) o al menos un epítipo de linfocito T de la misma, y en el que el genoma adenoviral de simio es el genoma del aislado 63 de adenovirus de chimpancé (AdCh63) en la fabricación de un medicamento para su uso como una vacuna anti-malaria.
- 40

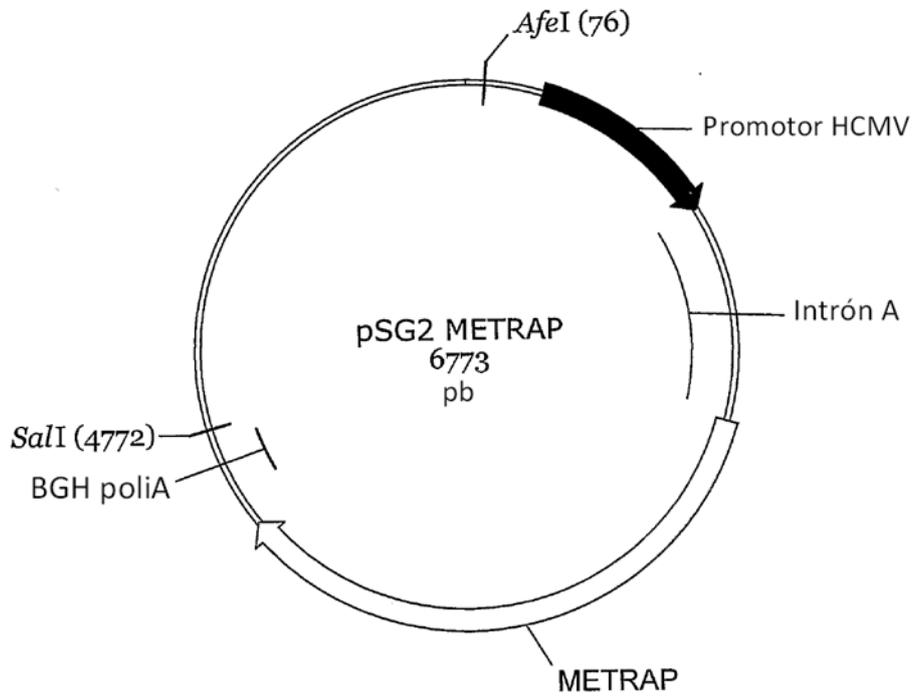


FIG. 1a

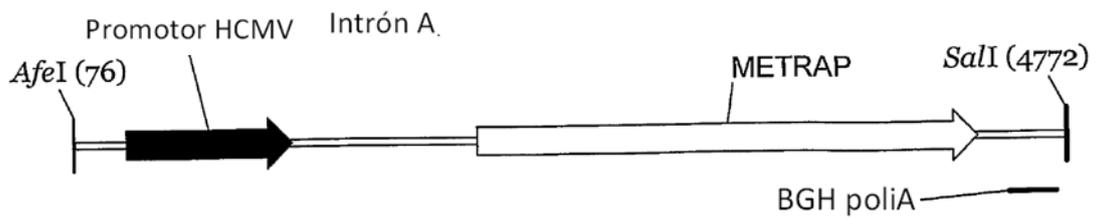


FIG. 1b

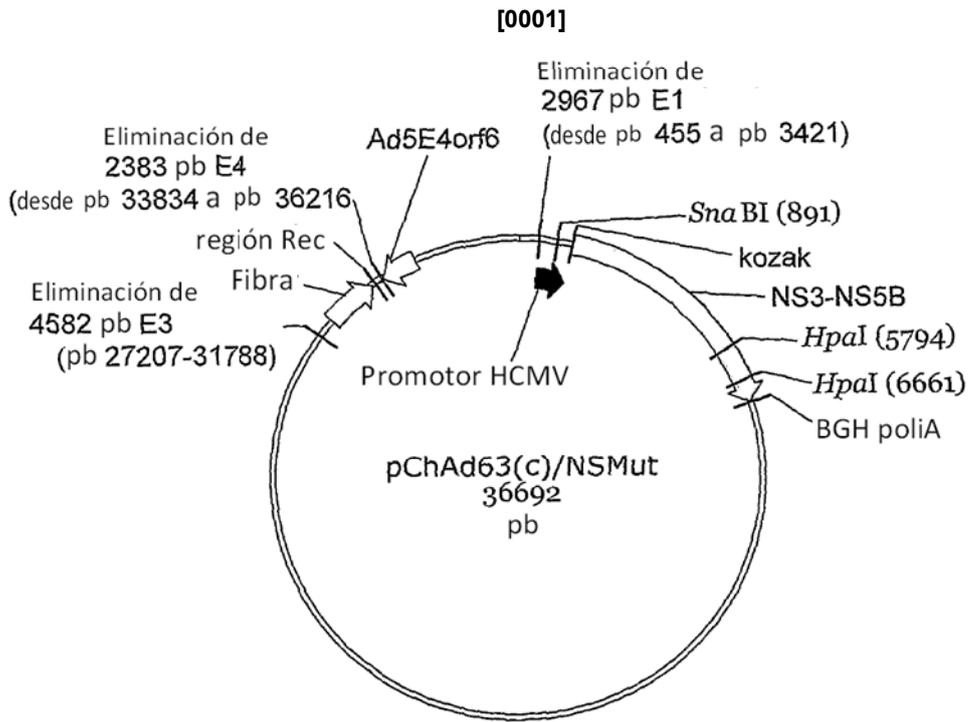


FIG. 1c

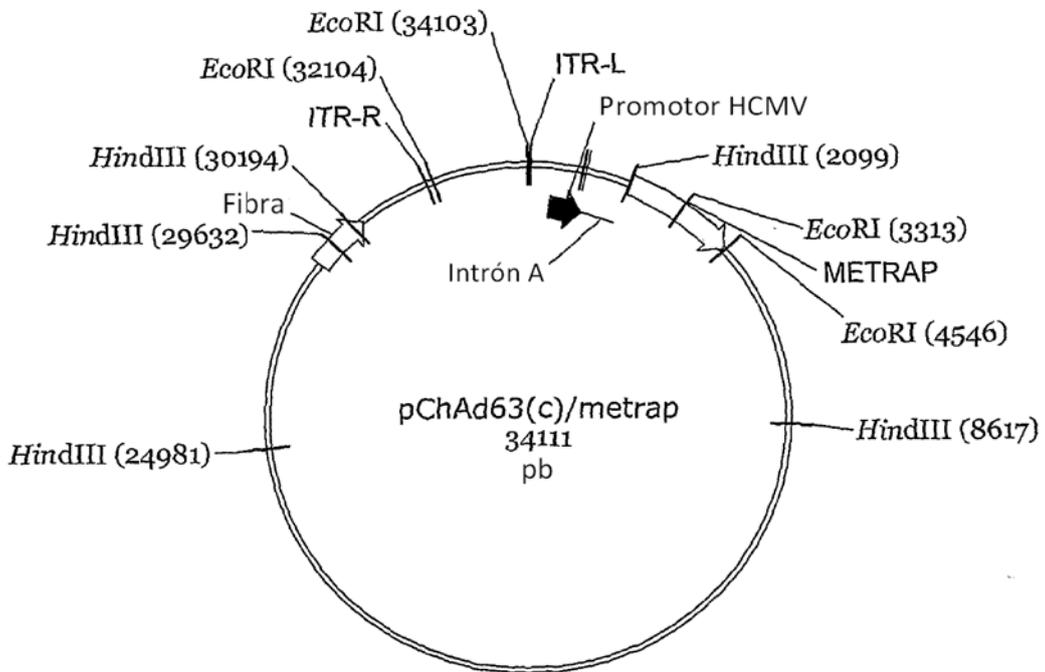


FIG. 1d



FIG. 2

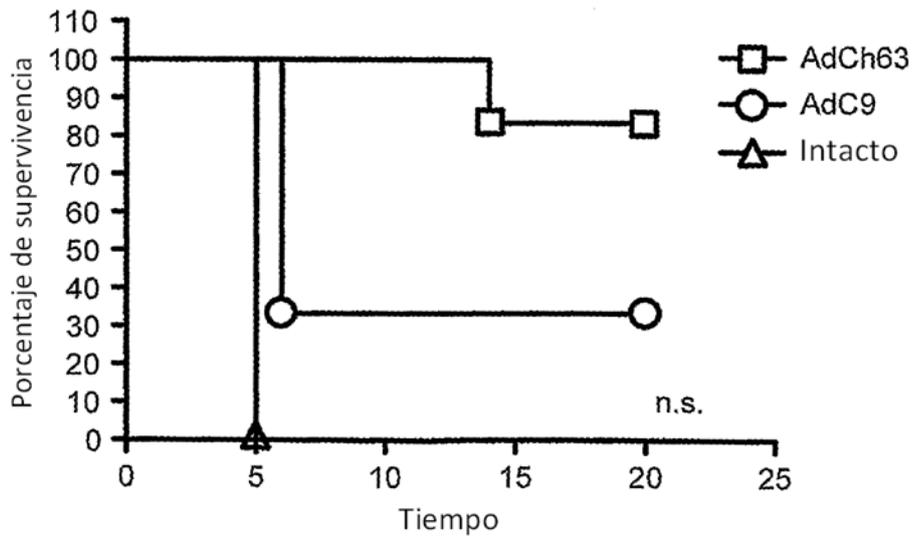


FIG. 3a

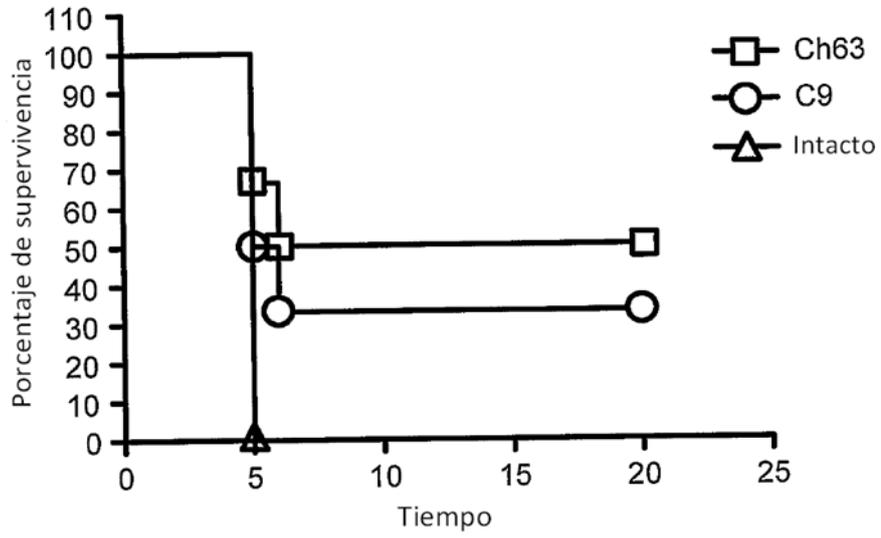


FIG. 3b

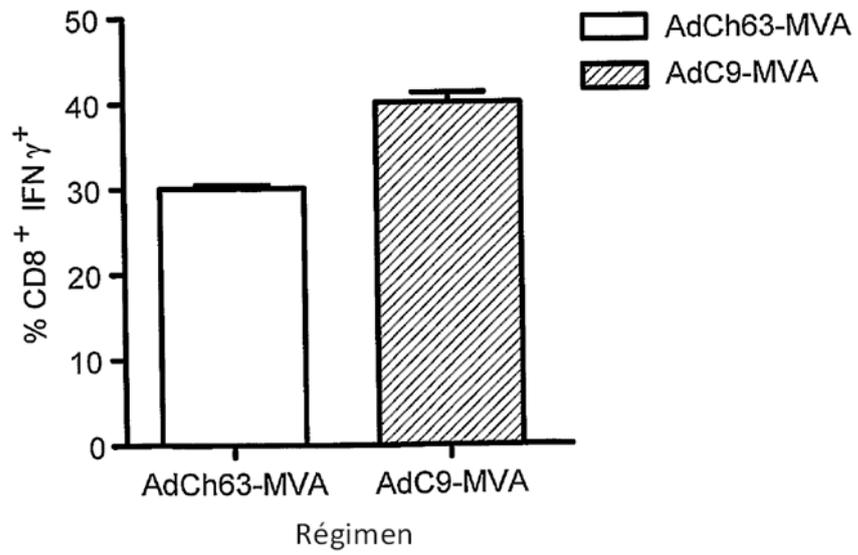


FIG. 4a

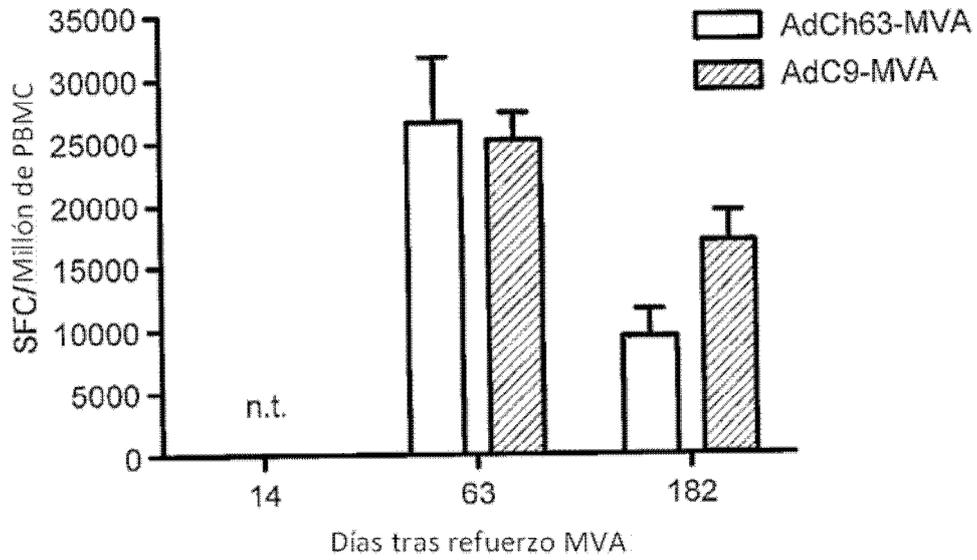


FIG. 4b

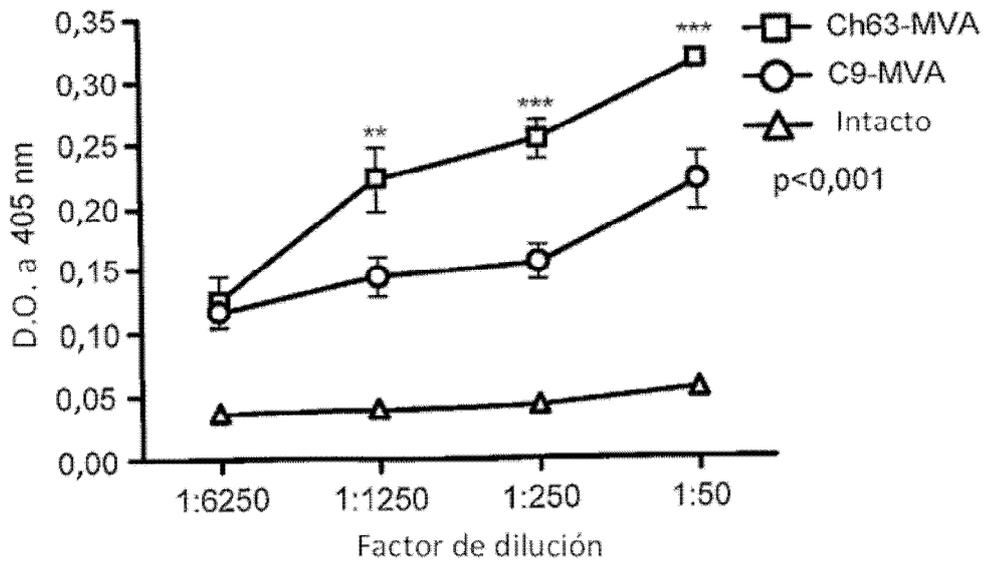


FIG. 4c

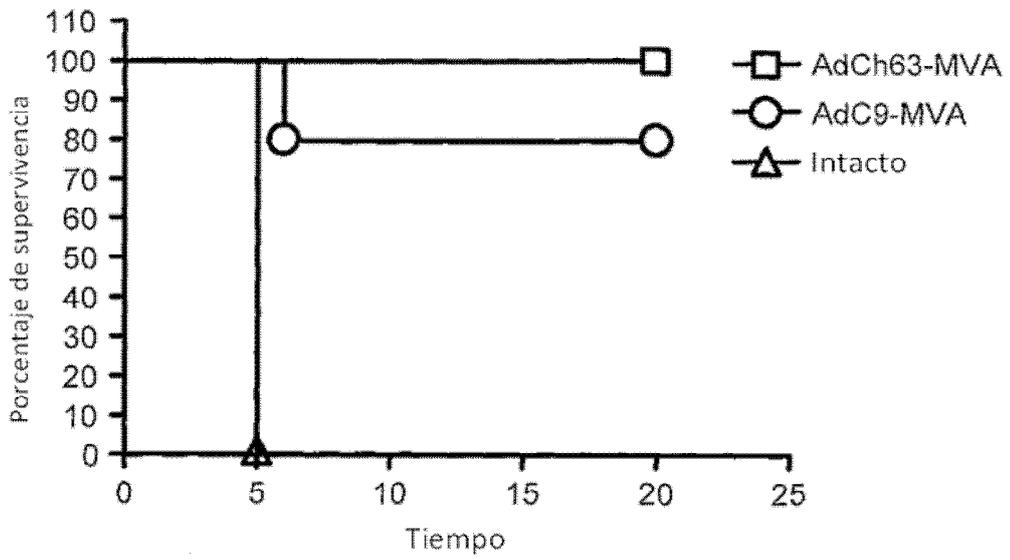


FIG. 5a

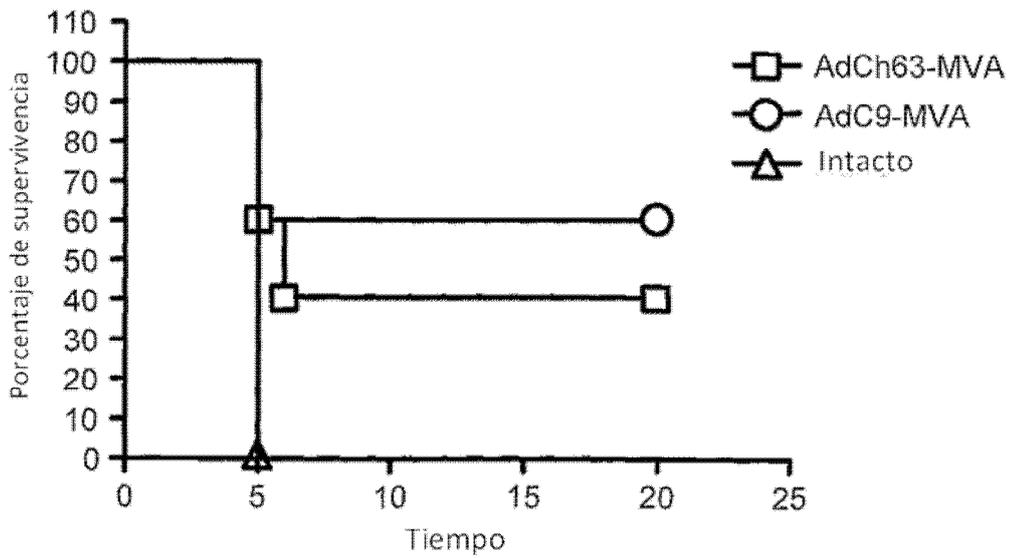


FIG. 5b

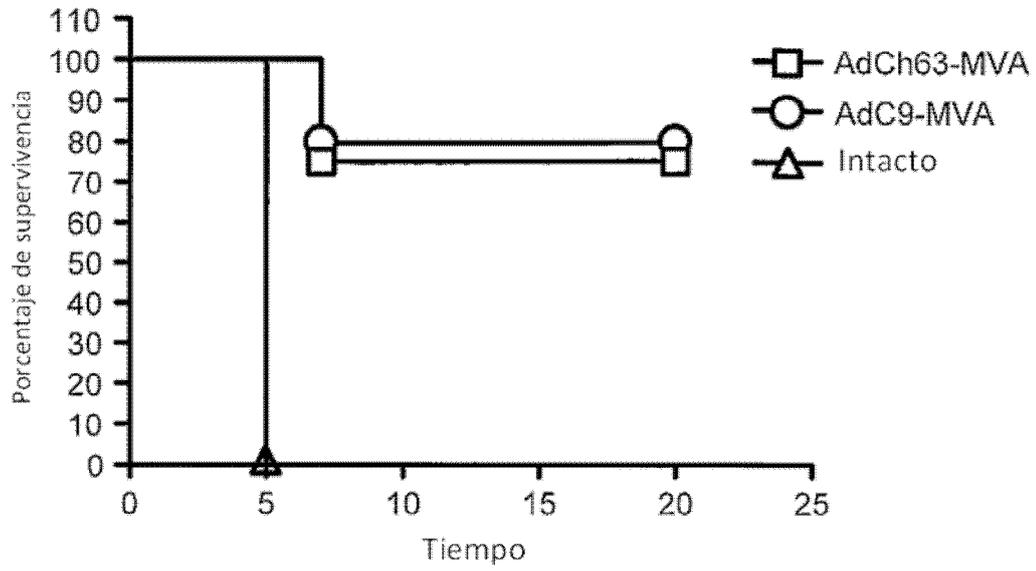


FIG. 5c

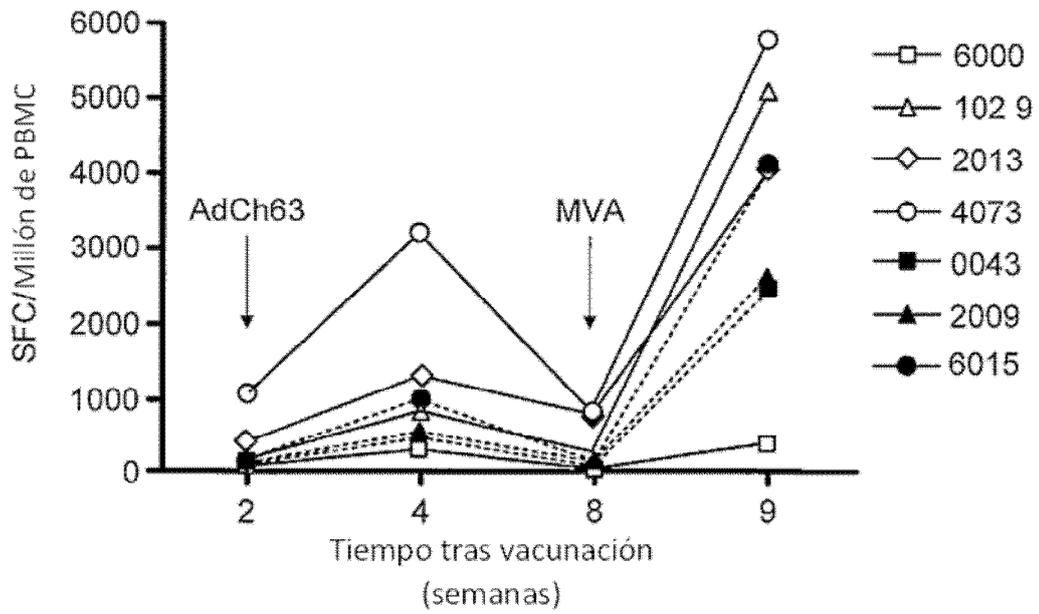


FIG. 6a

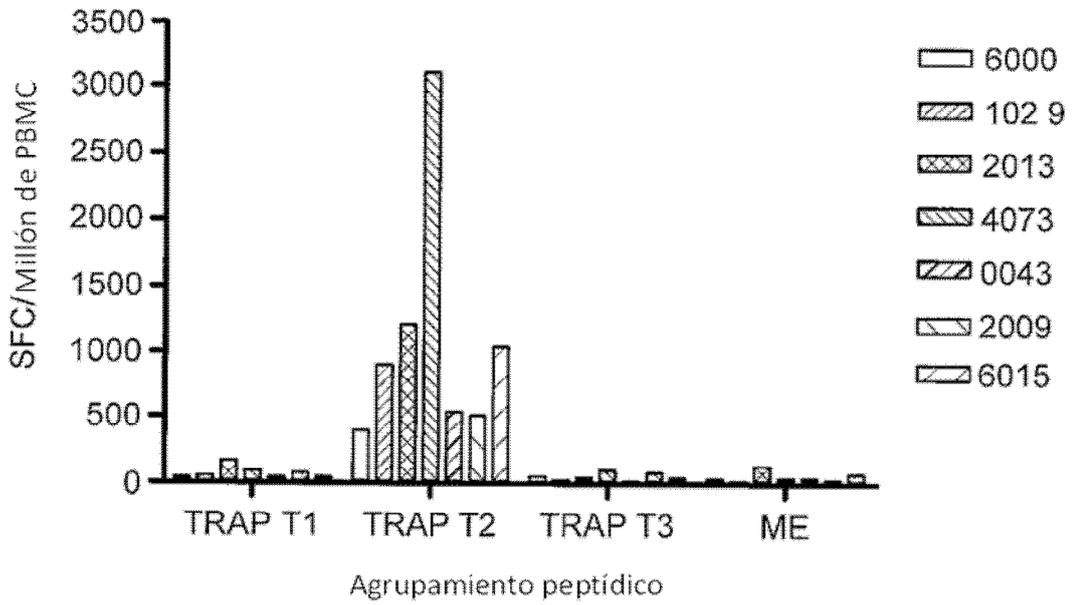


FIG. 6b

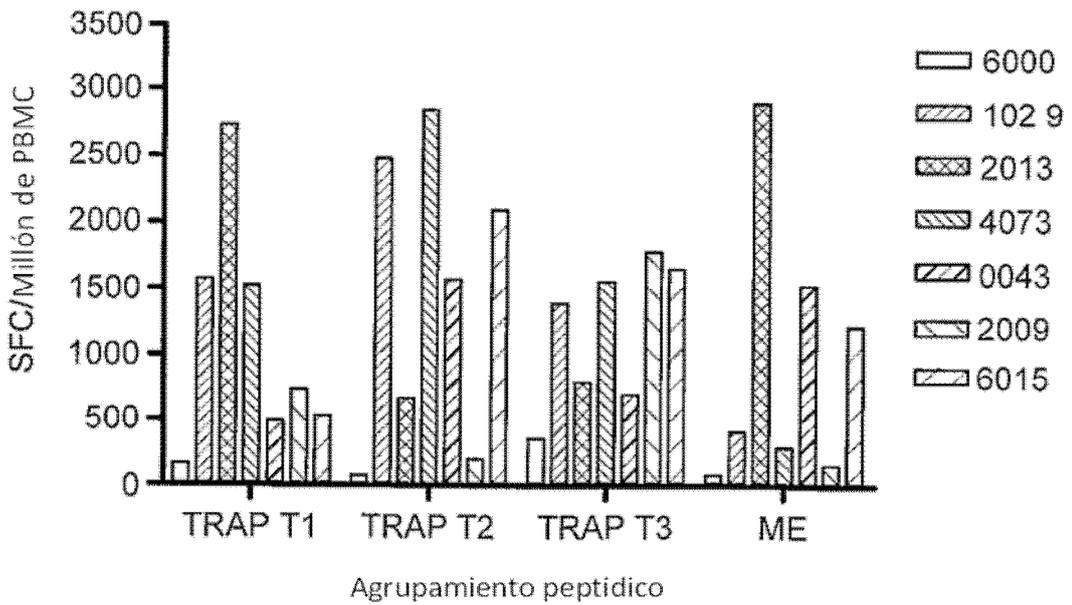


FIG. 6c

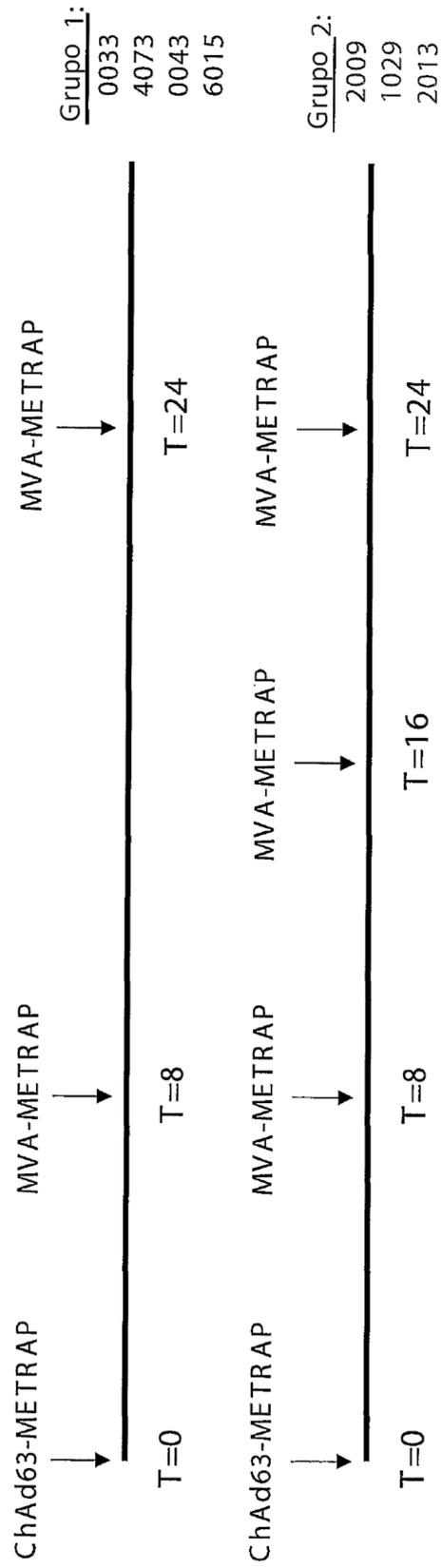
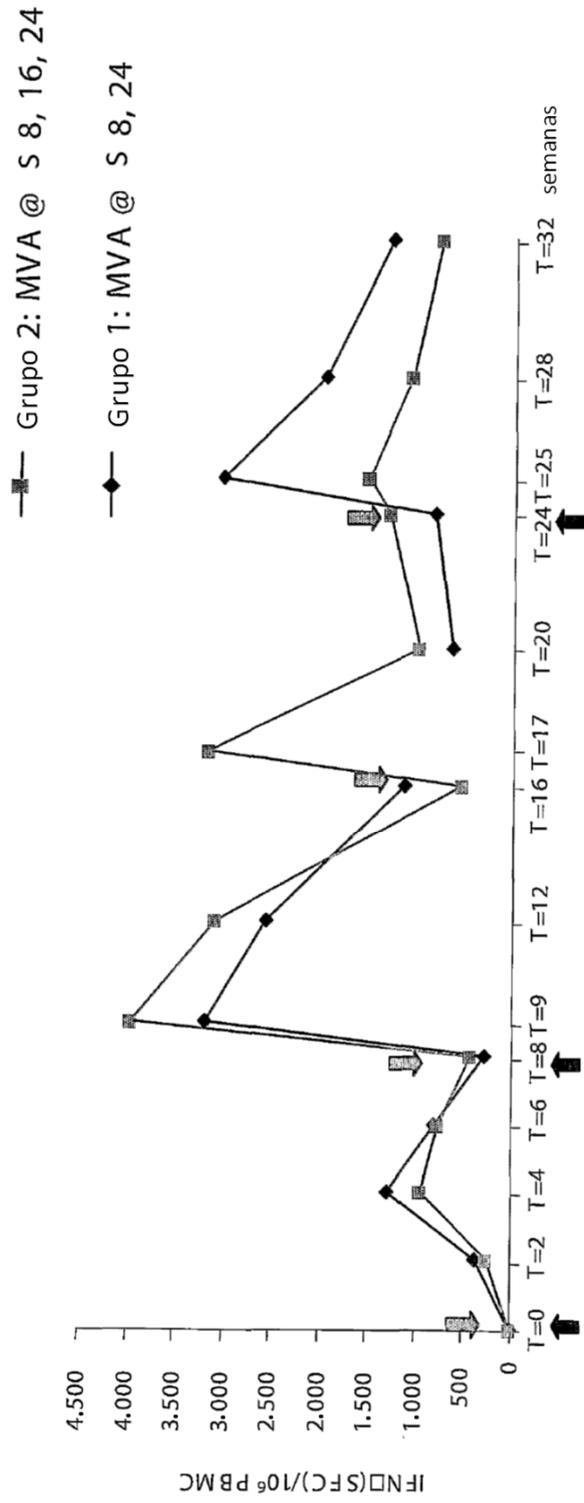


FIG. 7



Título de Ab contra proteína TRAP

FIG. 8a

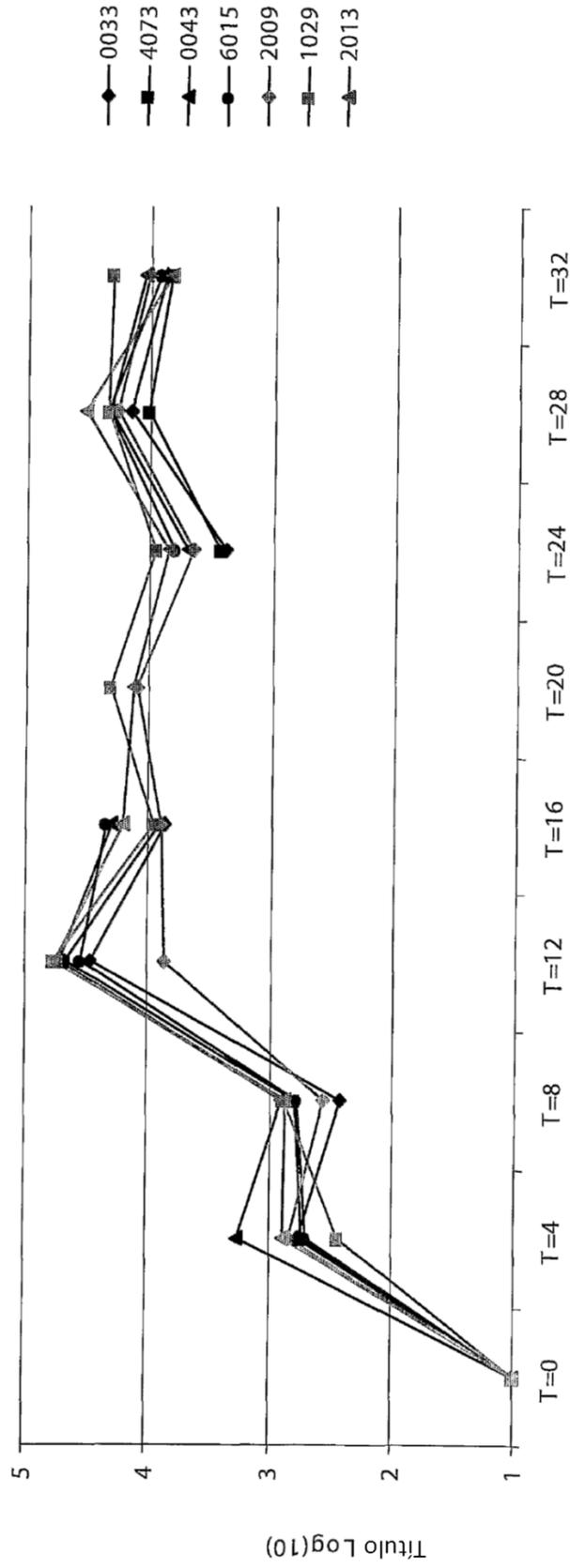


FIG. 8b

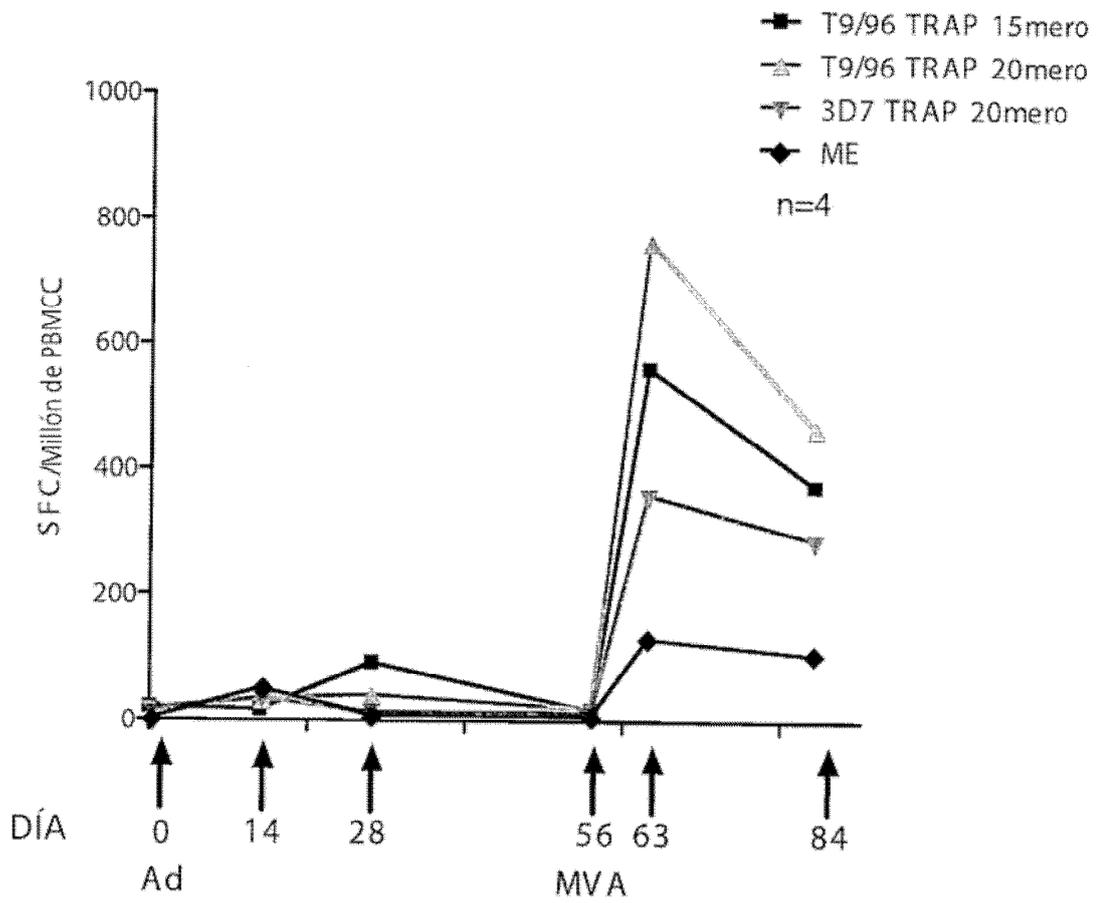


FIG. 9