

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 615**

51 Int. Cl.:

C12N 15/869 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2011** **PCT/US2011/036657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011** **WO11143653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011** **E 11781407 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2569436**

54 Título: **Vectores de CMVH y CMVRh recombinantes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.05.2010 US 334976 P

25.08.2010 US 376911 P

25.03.2011 US 29930 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2018

73 Titular/es:

OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
(100.0%)

690 SW Bancroft Street, Mail Code L 106TT
Portland, OR 97239 , US

72 Inventor/es:

PICKER, LOUIS;
NELSON, JAY, A.;
FRUEH, KLAUS;
JARVIS, MICHAEL, A. y
HANSEN, SCOTT, G.

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 660 615 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

Vectores de CMVH y CMVRh recombinantes y usos de los mismos

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes de patentes provisionales de Estados Unidos N.º de Serie 61/334.976 presentada el 14 de mayo de 2010 y 61/376.911 presentada el 25 de agosto de 2010 y la Solicitud de PCT PCT/US2011/029930 presentada el 25 de marzo de 2011.

10

Sector de la técnica

La presente invención describe vectores de citomegalovirus (CMV) recombinantes, tales como vectores de CMV humano (CMVH) y CMV de macaco rhesus (CMVRh), que codifican antígenos heterólogos y/o que son deficientes en genes que no son esenciales para el crecimiento *in vivo* y/o que son deficientes en genes que afectan a la replicación, diseminación dentro del hospedador y propagación entre hospedadores, y/o que se dirigen a diferentes tipos celulares (tropismo). En particular, la invención se refiere a vector de CMVRh o CMVH recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno específico patógeno humano aislado de virus de la inmunodeficiencia (VIH) y que incluye una supresión en uno o más genes que son esenciales para o aumentan la replicación del antígeno. La invención también describe el uso de vectores de CMV recombinantes como vacunas para el tratamiento o la prevención de enfermedad infecciosa y se refiere en particular al uso de vectores de CMV recombinantes como vacunas para el tratamiento o la prevención de VIH.

25 **Leyenda de financiación federal**

La presente invención fue apoyada, en parte, por las subvenciones números AI088442, AI21640, AI059457, AI070890, AI070890-03S1 y AI060392 concedidas por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de los Institutos Nacionales de Salud, y la subvención número RR00163 del Centro Nacional de Recursos de Investigación de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno federal puede tener ciertos derechos con respecto a la presente invención.

Sector de la técnica

Desde la aparición de la epidemia del SIDA a principios de los años 80, los investigadores se han centrado en el desarrollo de una vacuna eficaz para el VIH. Sin embargo, este esfuerzo se ha visto plagado de dificultades por diversas razones, incluyendo 1) replicación del VIH inicial explosiva que provoca infección sistémica rápida, 2) potentes mecanismos genéticos que median en la evasión inmunitaria innata y adaptativa, 3) maleabilidad genética y escape inmunitario, 4) supresión inmunitaria del hospedador y 5) la capacidad del VIH para integrarse dentro del genoma del hospedador e infectar de forma latente células de larga duración. Estas características inherentes del VIH han hecho difícil usar enfoques de vacuna tradicionales para generar una respuesta inmunitaria protectora usando antígenos del VIH bien expresados como proteínas recombinantes o bien en combinación con sistemas de expresión de vectores víricos no replicativos (sensibilización-refuerzo) (Barouch, D.H. 2008. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 455: 613-619). Uno de los objetivos de este proyecto es generar una vacuna del VIH eficaz y segura usando CMVH como un vector de vacuna.

El CMV es un virus ubicuo y un miembro de la subclase beta de la familia del herpesvirus. Es un virus de ADN bicatenario grande (genoma de aproximadamente 230 kB) que establece infección latente crónica o persistente. En países desarrollados tales como Estados Unidos, aproximadamente el 70 % de la población está infectada por CMVH dependiendo del estado socioeconómico. A diferencia de los herpesvirus gamma tales como el virus de Epstein-Barr y el herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi, el CMVH no es transformante y no es oncogénico. Una vacuna de CMV atenuada, viva (basada en la cepa de Towne del CMV humano, que carece de una parte del genoma de CMV) se ha administrado por inyección subcutánea a más de 800 sujetos en ensayos de seguridad y eficacia de fase II y III (Arvin *et al.* 2004 *Clin. Infect. Dis.* 39: 233-239). Aunque se ha descubierto que esta vacuna es segura, no ha sido completamente eficaz. Más recientemente, en un intento de aumentar su eficacia, se han reemplazado algunos de los genes ausentes en la cepa de la vacuna basada en Towne. Esta vacuna se ha ensayado en estudios de seguridad en fase II, y se ha descubierto que es segura (Arvin *et al.* 2004, *Clin. Infect. Dis.* 39: 233-239).

Aunque el CMVH es en general benigno en individuos sanos, el virus puede provocar una enfermedad devastadora en poblaciones inmunocomprometidas dando como resultado alta morbilidad y mortalidad (para una revisión, véase (Pass, R. F. 2001. *Cytomegalovirus*, p. 2675-2705. en P. M. H. David M. Knipe, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb Malcolm A. Martin, Bernard Roizman y Stephen E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4ª ed. Lippincott Williams y Wilkins, Filadelfia y Kenneson, A., y Cannon, M.J. 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 17: 253-276)). Aumentos recientes en el número de pacientes que se someten a terapia inmunosupresora después de trasplante de órgano sólido (TOS) o trasplante de células hematopoyéticas alogénicas (TCH), así como el uso expandido de TCH para enfermedades tales como anemia

falciforme, esclerosis múltiple y cánceres sólidos han aumentado el número de poblaciones de pacientes susceptibles a enfermedad de CMVH (Chou, S. 1999. *Transpl Infect Dis* 1: 105-14, Nichols, W. G., y M. Boeckh. 2000. *J Clin Virol* 16: 25-40 y Sepkowitz, K. A. 2002. *Clin Infect Dis* 34: 1098-107). El CMVH también es la infección vírica congénita más común, y la principal causa infecciosa del mal desarrollo del sistema nervioso central en neonatos (Fowler, K. B. *et al.* 1997. *J Pediatr* 130: 624-30, Larke, R. P. *et al.* 1980. *J Infect Dis* 142: 647-53 y Peckham, C. S. *et al.* 1983. *Lancet* 1: 1352-5). A este respecto, CMVH se considera la causa principal de sordera sensoroneural en neonatos independientemente del estado infeccioso (Fowler, K. B. *et al.* 1997. *J Pediatr* 130: 624-30). CMVH sigue siendo por lo tanto una causa importante de mortalidad en múltiples poblaciones de pacientes lo que enfatiza la necesidad de nuevas estrategias farmacológicas y de vacunas antivíricas. Se ha mostrado uniformemente que la inmunidad inducida por infección por CMV de tipo silvestre (WT) natural es incapaz de prevenir la reinfección por CMV (véase posteriormente). Esta característica única del CMV explica supuestamente la escasa eficacia de vacunas candidatas en ensayos para prevenir la infección por CMV (Pass, R. F. *et al.* 2009. *N Engl J Med* 360: 1191-9). No obstante, se ha mostrado que la inmunidad a CMVH adquirida mediante infección natural reduce significativamente la transmisión materno-fetal de CMVH durante el embarazo. Esta observación indicaría que la inducción de una inmunidad en mujeres embarazadas que es comparable a la inducida por infección por CMV natural, pero que se induce de una manera segura, puede ser capaz de reducir la transmisión materno-fetal y tener una influencia significativa en la enfermedad por CMV clínica en el neonato. También se ha mostrado que la inmunidad de linfocitos T específica de CMVH proporciona protección contra enfermedad de CMV en pacientes trasplantados, lo que presenta otra población en la que la capacidad de inducir con seguridad una inmunidad comparable a la adquirida por infección de CMV natural tendría una influencia clínica en la enfermedad de CMV (Leen, A. M., y H. E. Heslop. 2008. *Br J Haematol* 143: 169-79, Riddell, S. R., y P. D. Greenberg. 2000. *J Antimicrob Chemother* 45 Supl T3: 35-43 y Riddell, S. R. *et al.* 1994. *Bone Marrow Transplantation* 14: 78-84). El citomegalovirus es altamente inmunogénico, pero ha desarrollado mecanismos de evasión inmunitaria para permitir la persistencia del virus y la reinfección del hospedador seropositivo.

Los recursos inmunológicos dedicados específicamente a combatir la infección por CMVH son enormes, siendo el CMV uno de los virus más inmunogénicos conocidos. Se dirigen altos títulos de anticuerpos contra la glucoproteína de la envoltura del CMVH principal (gB) durante la infección primaria de individuos sanos (Alberola, J. *et al.* 2000. *J Clin Virol* 16: 113-22 y Rasmussen, L. *et al.* 1991. *J Infect Dis* 164:835-42), y contra múltiples proteínas víricas (tanto estructurales como no estructurales) durante la infección por CMVM de ratones (Farrell, H. E., y G. R. Shellam. 1989. *J Gen Virol* 70 (Pt 10): 2573-86). Una gran proporción del repertorio de linfocitos T del hospedador también se dirige contra antígenos del CMV, con una mediana de las frecuencias de respuesta de linfocitos T CD4⁺ 5-10 veces mayor para CMVH que para virus agudos (sarampión, paperas, gripe, adenovirus) o incluso otros virus persistentes tales como herpes simple y virus de la varicela zóster (Sylwester, A. W. *et al.* 2005. *J Exp Med* 202: 673-85). También se observa habitualmente una frecuencia alta de respuestas de CD8⁺ a epítopos o proteínas de CMVH (Gillespie, G. M. *et al.* 2000. *J Virol* 74: 8140-50, Kern, F. *et al.* 2002. *J Infect Dis* 185: 1709-16, Kern, F. *et al.* 1999. *Eur J Immunol* 29: 2908-15, Kern, F. *et al.* 1999. *J Virol* 73: 8179-84 y Sylwester, A. W. *et al.* 2005. *J Exp Med* 202: 673-85). En un estudio humano a gran escala que cuantifica las respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ al genoma de CMVH completo, las frecuencias medias de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de CMV superaron el 10 % de la población de memoria para ambos subconjuntos (Sylwester, A. W. *et al.* 2005. *J Exp Med* 202: 673-85). En una realización de la invención, no fue poco habitual que los linfocitos T específicos de CMV representaran >25 % del repertorio de linfocitos T de memoria de un individuo específico o en sitios tisulares específicos. La importancia clínica de este alto nivel de inmunidad específica de CMV se muestra más claramente por la aparición de enfermedad de CMV multi-orgánica en individuos inmunosuprimidos durante el trasplante, y la capacidad de transferencia adoptiva de linfocitos T para proteger estos pacientes de enfermedad de CMV (Riddell, S. R. *et al.* 1994. *Bone Marrow Transplantation* 14: 78-84).

En resumen, a pesar de la aparente seguridad de las vacunas de CMV atenuadas, vivas, sigue habiendo preocupaciones significativas con estrategias de vacunas basadas en CMV vivas. Dado los problemas que pueden surgir en individuos inmunosuprimidos, tales como enfermos de SIDA, receptores de trasplantes de órganos o niños que se infectaron en el útero y que receptores potenciales de una vacuna basada en CMV pueden ser o convertirse en inmunodeficientes, se limita significativamente la utilidad de una vacuna de CMV viva. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad continuada de un vector de vacuna de CMV que sea seguro y eficaz en todos los individuos.

La cita o identificación de cualquier documento en la presente solicitud no es una admisión de que dicho documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

Objeto de la invención

La presente invención describe vectores recombinantes, provechosamente vectores víricos tales como vectores de CMVRh o CMVH que pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, en el que el antígeno heterólogo es un antígeno específico de patógeno humano o un antígeno tumoral. El antígeno puede ser un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario o un antígeno expresado por un cáncer hematológico.

Los vectores de CMVRh o CMVH de la presente invención pueden contener supresiones. La supresión puede estar en regiones génicas no esenciales para el crecimiento *in vivo*. Las regiones génicas pueden estar en la familia RL11, la familia pp65, la familia US12 y la familia US28. El gen suprimido puede ser US2, US3, US6, US11, UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44, o un homólogo de los mismos.

El vector de CMVRh puede tener supresiones de Rh182-189, Rh158-166. El vector de CMVRh también puede tener supresiones en regiones génicas en la familia RL11, la familia pp65, la familia US12 y la familia US28. En particular, el vector de CMVRh puede tener supresiones en Rh13-Rh29, Rh111-RH112, Rh191-Rh202 y Rh214-Rh220, específicamente Rh13.1, Rh19, Rh20, Rh23, Rh24, Rh112, Rh190, Rh192, Rh196, Rh198, Rh199, Rh200, Rh201, Rh202 y Rh220.

El vector de CMVRh o CMVH también puede ser un vector defectuoso en tropismo. Provechosamente, el vector defectuoso en tropismo puede carecer de genes requeridos para el crecimiento óptimo en ciertos tipos celulares o puede contener dianas para micro-ARN específicos de tejido en genes esenciales para la replicación vírica. En particular, el vector defectuoso en tropismo puede tener un tropismo deficiente epitelial, del sistema nervioso central (SNC), de macrófagos o una combinación de los mismos.

El vector de CMVH también puede tener supresiones en regiones génicas en la familia RL11, la familia pp65, la familia US12 y la familia US28. En particular, el vector de CMVH puede tener supresiones en RL11, UL6, UL7, UL9, UL11, UL83 (pp65), US12, US13, US14, US17, US18, US19, US20, US21 y UL28.

Los objetos adicionales de la invención incluyen cualquiera o todos de: proporcionar productos de expresión a partir de dichos recombinantes, métodos para expresar productos a partir de dichos recombinantes, composiciones que contienen los recombinantes o los productos de expresión, métodos para usar los productos de expresión, métodos para usar las composiciones, ADN de los recombinantes, y métodos para replicar ADN a partir de los recombinantes.

La presente invención también describe un método para tratar a un sujeto con una enfermedad infecciosa, o en riesgo de infectarse con una enfermedad infecciosa, o con cáncer, o en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende seleccionar un sujeto que necesite tratamiento y administrar al sujeto el vector de CMVRh o CMVH recombinante desvelado en el presente documento.

En consecuencia, es un objeto de la invención no abarcar dentro de la invención ningún producto previamente conocido, el proceso de preparación del producto o el método de uso del producto de modo que los solicitantes se reservan el derecho y desvelan por la presente un descargo de responsabilidad de cualquier producto, proceso o método previamente conocido. Se observa además que la invención no pretende abarcar dentro del alcance de la invención ningún producto, proceso o preparación de producto o método de uso del producto, que no cumpla la descripción escrita y los requisitos de suficiencia del USPTO (35 U.S.C. §112, primer párrafo) o el EPO (Artículo 83 del EPC), de modo que los Solicitantes se reservan el derecho y desvelan por la presente un descargo de responsabilidad de cualquier producto, proceso de preparación de producto o método de uso del producto previamente descrito.

Se observa que en la presente divulgación y particularmente en las reivindicaciones y/o los párrafos, expresiones tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido a ellas en la ley de Patente de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares; y que expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado atribuido a ellas en la ley de Patente de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no enumerados de forma explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras realizaciones se desvelan o resultan evidentes a partir de, y están abarcadas por, la siguiente Descripción Detallada. Más particularmente, se reivindica:

Un vector de CMVRh o CMVH recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, en el que el antígeno heterólogo es un antígeno específico de patógeno humano aislado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en el que el vector incluye una supresión de uno o más genes de CMVRh o CMVH que son esenciales para o aumentan la replicación.

El al menos un gen esencial o de aumento puede seleccionarse de UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44, o un homólogo de los mismos.

El vector de CMVRh o CMVH recombinante puede comprender una supresión de US2, US3, US6 o US11 o un homólogo de los mismos, en particular que comprende una supresión de Rh158-166 o un homólogo del mismo.

El vector de CMVH recombinante puede comprender una supresión de UL64 o US29, o una combinación de los mismos.

El vector de CMVRh o vector de CMVH recombinante puede tener una supresión en regiones génicas no esenciales para el crecimiento *in vivo*, en particular en la que las regiones génicas se seleccionan del grupo que consiste en la familia RL11, la familia pp65, la familia US12 y la familia US28. En particular, las regiones génicas de CMVRh pueden seleccionarse del grupo que consiste en Rh13-Rh29, Rh111-Rh112, Rh191-Rh202 y Rh214-Rh220, en particular en las que las regiones génicas de CMVRh se seleccionan del grupo que consiste en Rh13.1, Rh19, Rh20, Rh23, Rh24, Rh112, Rh190, Rh192, Rh196, Rh198, Rh199, Rh200, Rh201, Rh202 y Rh220. Las regiones génicas de CMVH también pueden seleccionarse del grupo que consiste en RL11, UL6, UL7, UL9, UL11, UL83 (pp65), US12, US13, US14, US17, US18, US19, US20, US21 y UL28. El vector de CMVRh o CMVH recombinante puede comprender sitios LoxP que flanquean un gen esencial o una región del genoma de CMVRh o CMVH. El vector de CMVRh o CMVH recombinante puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica Cre recombinasa regulada por tetraciclina (Tet).

Una composición que comprenden el vector de CMVRh o CMVH recombinante como se ha definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El vector de CMVRh o CMVH recombinante, o la composición como se ha definido anteriormente, para su uso en un método para tratar a un sujeto con una enfermedad infecciosa, en el que la enfermedad infecciosa está provocada por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

El vector de CMVRh o CMVH recombinante, o la composición como se ha definido anteriormente, para su uso en un método para tratar a un sujeto en riesgo de infectarse con una enfermedad infecciosa, en el que la enfermedad infecciosa está provocada por VIH.

Descripción de las figuras

La siguiente descripción detallada, proporcionada como ejemplo, pero que no se pretende que limite la invención solamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos.

La **FIG. 1** es un par de gráficas que muestra el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sujetos CMV positivos y CMV negativos que responden a ORF de CMVH. Se muestra el porcentaje de linfocitos T sensibles de linfocitos T de sangre periférica (SP) (parte superior) o linfocitos T de SP de memoria (parte inferior).

La **FIG. 2** es un conjunto de gráficas que muestran el porcentaje de donantes CMV seropositivos con respuestas de linfocitos T (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) a CMV completo u ORF seleccionadas en SP (parte superior); las frecuencias de respuesta medias dentro de la población de linfocitos T de SP totales a ORF de CMVRh (parte media); y las frecuencias de respuesta medias dentro de la población de linfocitos T de SP de memoria a ORF de CMVRh seleccionadas.

La **FIG. 3** es una serie de representaciones de FACS que muestran respuestas de linfocitos T de sangre periférica robustas a CMVRh.

La **FIG. 4** es un conjunto de gráficas que muestran respuestas de linfocitos T de sangre periférica a CMVRh en 27 hombres adultos. Se muestra el porcentaje de MR CMV seropositivos con respuestas de linfocitos T ($\geq 0,1$ % a CMV completo u ORF de CMV seleccionadas) (izquierda); y frecuencias de respuesta de linfocitos T medias a CMV completo (parte media) u ORF de CMV seleccionadas (derecha) entre MR sensibles.

La **FIG. 5** es una serie de representaciones de FACS que muestran que linfocitos T de memoria específicos de CMVRh están altamente enriquecidos en el bazo y en el pulmón. Se muestran seis mil acontecimientos, seleccionados basándose en linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ totales representando el “%+” las frecuencias de respuesta netas después de restar el fondo dentro de estos subconjuntos. Las células sensibles son todas células de memoria, y en el ejemplo mostrado, la fracción de linfocitos T de memoria totales (el verdadero denominador o la respuesta) varía del 45 %/75 % (CD4/CD8) en la sangre al 100 %/100 % en el pulmón. Por lo tanto, las frecuencias de respuesta dentro de los subconjuntos de memoria CD4⁺ y CD8⁺ son las siguientes: respuesta de CD4 a CMV completo (sangre/bazo/pulmón) = 0,56 %/4,943 %/17,4 %; respuesta de CD8 a pp65A (sangre/bazo/pulmón) = 1,45 %/1,69 %/3,13 %.

La **FIG. 6** es una serie de gráficas que muestran pruebas inmunológicas de reinfección por CMVRh y representa frecuencias de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de CMV/estado proliferativo en sangre y títulos de anticuerpos en plasma después de la reinfección.

La **FIG. 7** es una ilustración esquemática de recombinación basada en Cre/LoxP para la construcción de recombinantes de CMVRh/VISmac239gag basados en CMVRhVLoxP.

La **FIG. 8** es una imagen de una inmunotransferencia que demuestra reinfección por CMVRh/VISgag de MR CMVRh seropositivos.

La **FIG. 9** es una serie de representaciones de FACS que muestran rápida aparición de linfocitos T CD4⁺ específicos de gag en sangre después de una única inoculación de MR CMV seropositivos (n.º 19997) con un vector de CMVRh(gag) de primera generación.

La **FIG. 10** es una serie de representaciones de FACS que muestran localización preferente de linfocitos T específicos de gag en el pulmón después de reinfección por CMVRh(gag) (n.º 21046; día 56; reinfección n.º 1).

La **FIG. 11** es una serie de gráficas que muestran el desarrollo de linfocitos T específicos de gag con reinfección por CMVRh(gag) (x2).

La **FIG. 12** es una gráfica que muestra el desarrollo de anticuerpos anti-gag a lo largo del tiempo después de

reinfección inicial.

La **FIG. 13** es una gráfica que muestra una comparación de frecuencias de linfocitos T específicos de gag en MR inmunizados con VIS(Δ nef) y CMVRh(gag). En ambos grupos, las respuestas de linfocitos T específicos de gag tanto CD4⁺ como CD8⁺ fueron mayores en el pulmón en comparación con la sangre, incluso aunque los porcentajes en sangre se corrigieron por memoria.

La **FIG. 14** es una serie de representaciones de FACS que proporcionan la cuantificación y caracterización de respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre periférica de un MR adulto joven a mezcla de 15 unidades de CMVRh IE-1 por citometría de flujo de citocinas de 10 colores.

La **FIG. 15** es una ilustración de la construcción de vectores de vacunas de CMVRh y CMVH. Se insertan un antígeno o antígenos de patógenos heterólogos en cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de CMVRh o CMVH por recombinación E/T y mediada por Fip.

La **FIG. 16** es una ilustración de un vector de vacuna seguro de CMVRh/CMVH regulado por tetraciclina ejemplar. Este vector de seguridad de CMVRh/CMVH contiene dos componentes genéticos que interactúan dentro del genoma de CMVRh/CMVH que permiten juntos la inactivación de vector inducida por Tet.

La **FIG. 17** es una ilustración de otro vector de vacuna de seguridad de CMVRh/CMVH regulado por tetraciclina ejemplar. Dichos vectores de vacuna de CMVRh/CMVH se construyen colocando un gen esencial para replicación vírica (en este ejemplo, *Rh70* (homólogo de CMVH-*UL44*); factor de procesividad del ADN polimerasa), bajo el control del sistema inducible por Tet ilustrado en la FIG. 10.

La **FIG. 18** es una ilustración de otro vector de vacuna de seguridad de CMVRh/CMVH regulado por tetraciclina ejemplar. Se construyen dichos vectores de vacuna de CMVRh/CMVH que contienen un gen citotóxico (CytoG) bajo el control del sistema inducible por Tet como se detalla en la FIG. 11. Después de inoculación de animales con vectores regulados por Tet en ausencia de Dox, la replicación vírica puede inactivarse rápidamente por inducción mediada por Dox del gen citopático que da como resultado muerte de la célula infectada por vector de vacuna.

La **FIG. 19** es una ilustración de la construcción de vectores de terapia génica de CMVRh y CMVH ejemplares. Se insertan un gen o genes terapéuticos en cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de CMVRh o CMVH mediante recombinación E/T y mediada por Fip. El esquema muestra una estrategia generalizada para la inserción de un gen terapéutico marcado por epítipo en la región no codificante entre rh213 y Rh214 de CMVRh. Esta estrategia puede usarse de forma similar para la inserción de genes terapéuticos en otros sitios definidos dentro del genoma de CMVRh/CMVH.

La **FIG. 20** es un par de gráficas que muestra la respuesta de linfocitos T a CMVRh que carece de pp71. Se inocularon dos MR seronegativos s.c. con 10⁷ UFP de CMVRh Δ pp71 el día 0. La respuesta de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ contra péptidos solapantes de CMVRh IE y pp65 se midió por tinción de citocina intracelular en PBMC y BAL a los intervalos indicados.

La **FIG. 21** es una gráfica que muestra niveles de miR-142-3p por análisis de RT-PCR cuantitativa a partir de ARN total de células de fibroblastos de embriones de ratón (MEF), células de macrófagos IC-21 (IC-21), células dendríticas de sangre periférica (CD SP) y células dendríticas de médula ósea (CD MO). Los niveles de miR-142-3p fueron al menos 7000 veces mayores en células dendríticas/macrófagos que en MEF. Los niveles de miR-142-3p para MEF están dentro de niveles de fondo convencionales para ensayos de RT-PCR de miARN ABI (sección gris).

La **FIG. 22** es una gráfica que muestra la comparación del nivel de replicación de CMV murino (CMVM) de virus de control IE3-015 e IE3-142 después de infección con MOI=0,1 de fibroblastos 3T3. Se llevaron a cabo ensayos en placas convencionales en fibroblastos 3T3.

La **FIG. 23** es una gráfica que muestra la comparación del nivel de replicación de CMVM de virus de control IE3-015 e IE3-142 después de infección con MOI=0,1 de macrófagos IC-21.

La **FIG. 24** es una gráfica que muestra niveles de ARNm de IE1 e IE3 después de la infección de fibroblastos 3T3 con CMVM.

La **FIG. 25** es una gráfica que muestra niveles de ARNm de IE1 e IE3 después de la infección de macrófagos IC-21 con CMVM.

La **FIG. 26** es un esquema que muestra el protocolo para evaluación de la inmunogenia de diseminación de CMVRh y en MR adultos/jóvenes.

La **FIG. 27** es una imagen de un gel que muestra que CMVM/VP1_{PV1} expresa de forma estable VP1 *in vitro*.

La **FIG. 28** (a) es una representación esquemática de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} y vector derivado de CMVM que porta el epítipo de CTL de la proteína NP del virus del Ébola Zaire. (b) muestra una representación gráfica de los resultados de un estudio de inmunogenia en ratones 129S1/SvImJ/Cr restringidos a H2b cuando se inmunizan con diferentes construcciones de vectores de MCM. (c) muestra una representación gráfica de las respuestas típicas de ratones vacunados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. La mayoría de linfocitos T sensibles a NP de ZEBOV son polifuncionales (que expresan tanto IFN γ como TNF α) y son específicos para el epítipo de NP (no observado después de incubación con el péptido PSA o controles no estimulados). De forma coherente con la infección por CMVM, todos los ratones demuestran respuestas de linfocitos T a CMVM M45.

La **FIG. 29** es una gráfica que representa el análisis cinético de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ a CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}.

La **FIG. 30** es una gráfica que muestra que CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} induce una respuesta de linfocitos T específica de ZEBOV en ratones C57BL/6.

La **FIG. 31** (a) es una gráfica que muestra la eficacia protectora de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} con respecto a supervivencia (%). (b) es una gráfica que muestra la eficacia de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} con respecto a cambio del

peso corporal (%). (c) es una gráfica que muestra la eficacia protectora de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} con respecto a viremia (FFU/ml).

La **FIG. 32** es un gel que muestra un control WT y dos clones independientes de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (5A1 y 5D1) digeridos con EcoRI seguido de electroforesis.

La **FIG. 33** muestra el análisis de crecimiento Multi-etapa de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}.

La **FIG. 34** muestra regiones génicas de CMVRh que no son esenciales para superinfección.

La **FIG. 35** muestra inmunogenia de vectores de CMVRh/VIS con supresión de genes específicos o familias génicas (respuestas de linfocitos T CD8+ específicas de VISgag o VISrtn; linfocitos de lavado broncoalveolar).

La **FIG. 36** es un par de gráficas que muestran que la supresión de pp71 altera la liberación vírica de fibroblastos normales, pero no de fibroblastos que expresan pp71.

La **FIG. 37** muestra que la supresión de pp71 atenúa vectores de CMV *in vivo* pero no altera su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria de larga duración comparable al virus de tipo silvestre.

La **FIG. 38** muestra que vectores de CMV con pp71 suprimido que expresan un antígeno heterólogo son capaces de superinfectar animales infectados por CMV e inducir una respuesta inmunitaria de larga duración al antígeno heterólogo pero no se secretan de animales infectados.

La **FIG. 39** muestra la construcción y caracterización *in vitro* de CMVM/TetC. (a) Representación esquemática de CMVM/TetC. Se colocó un fragmento C de 50 kD marcado con epítipo V5 de toxina del tétanos bajo el control del promotor de EF1 α y se insertó en el genoma de CMVM para reemplazar el gen de M157 dentro del BAC de CMVM, pSMfr3. (b) El análisis de crecimiento *in vitro* de virus reconstituidos mostró cinética de replicación comparable a CMVM WT. Las barras de error muestran la desviación típica (d.t.). (c) El análisis de expresión de fragmento C de TT en lisados celulares de MEF infectados con CMVM/TetC (pase de virus 5) muestra expresión *in vitro* estable del fragmento C marcado con V5 a lo largo del tiempo (días 1-3) después la infección.

Listado de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de una letra convencionales para bases nucleotídicas y código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solamente se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida por cualquier referencia a la hebra presentada.

El Listado de Secuencias se presenta como un archivo de texto ASCII, creado el 14 de mayo de 2010, 2.953. En el listado de secuencias adjunto:

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de CMVRh (herpesvirus de Cercopitecino 8)

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de CMVH (cepa de laboratorio AD169).

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de CMVH (cepa de tipo silvestre Merlin).

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos del aislado de CMVH Towne BAC.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos del aislado de CMVH PH-BAC.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos del aislado de CMVH Toledo-BAC.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos del aislado de CMVH TR-BAC.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos del aislado de CMVH FIX-BAC.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos del aislado de CMVH AD 169-BAC.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de VIS.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de gap-pol de VIS.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la proteína gag de VIS.

Descripción detallada de la invención

Paradójicamente, los altos niveles de inmunidad específica de CMV son incapaces de erradicar el virus del individuo infectado sano, o conferir protección del individuo seropositivo para CMV contra reinfección. Se ha creído durante mucho tiempo que esta capacidad de CMV para escapar a la erradicación por el sistema inmunitario, y de reinfectar al hospedador seropositivo está ligada a los múltiples inmunomoduladores víricos codificados por el virus (para una revisión, véase (Mocarski, E. S., Jr. 2002. Trends Microbiol 10: 332-9)). De forma coherente con la reactivación crónica/replicación persistente dentro del hospedador, CMV también induce y mantiene una respuesta inmunitaria de linfocitos T característica y única. Los linfocitos T de memoria inducidos por vacunación o infección pueden caracterizarse ampliamente en linfocitos de memoria efectoras (T_{EM}) o centrales (T_{CM}), lo que se deduce a partir de las funciones definidas de estas dos poblaciones de memoria (Cheroutre, H., y L. Madakamutil. 2005. Cell Mol Life Sci 62: 2853-66; Mackay, C. R. *et al.* 1990. J Exp Med 171: 801-17; Masopust, D. *et al.* 2001. Science 291: 2413-7; Sallusto, F. *et al.* 1999. Nature 401: 708-12 y Wherry, E. J. *et al.* 2003. Nat Immunol 4: 225-34). Se han descrito adicionalmente realizaciones de la invención que se refieren a inmunomoduladores y la respuesta de linfocitos T única inducida por CMVH en el documento PCT/US2011/029930.

Otras realizaciones de la invención se refieren a vacunas de CMV atenuadas que son incapaces de o tienen alterada su capacidad de replicar en células y tejidos asociados con transmisión de CMV y enfermedad. La base de este enfoque de vacuna es la capacidad única de CMVH para inducir respuestas de linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) grandes y duraderas a antígenos víricos que proporciona a vectores basados en CMVH el potencial de generar

respuestas de linfocitos T basadas en sitio efector de alta frecuencia que interceptarían y suprimirían la replicación de VIH muy pronto en la infección, cuando el virus es más vulnerable al control inmunitario. La inmunización de macacos rhesus (MR) con vectores de vacuna de CMVRh/VIS competentes para replicación induce una gran respuesta de T_{EM} de larga duración a antígenos del VIS que han proporcionado inmunidad protectora al 50 % de los animales después de exposición rectal a VISmac239 altamente patógeno (Hansen, S.G., Vieville, C., Whizin, N., Coyne-Johnson, L., Siess, D.C., Drummond, D.D., Legasse, A.W., Axthelm, M.K., Oswald, K., Trubey, C.M., *et al.* 2009. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med* 15: 293-299). Tanto la respuesta inmunitaria anti-VIS como la protección mediada por estos vectores de CMVRh/VIS carecían de precedentes en comparación con candidatos de vacuna actuales, y proporciona ahora la base del desarrollo de una vacuna de VIH eficaz.

Además, las realizaciones de la presente invención se refieren a la capacidad única del CMVRh para reinfectar MR sero+ a pesar de la presencia de una respuesta inmunitaria anti-CMVRh significativa. Por el contrario, la mayoría de los vectores de vacuna de VIH actuales (es decir, vectores basados en la viruela y adenovirus) están comprometidos por la inmunidad anti-vector que permite solamente un único uso eficaz de estas plataformas de vacuna. Esta propiedad inherente de vectores de CMV puede atribuirse al repertorio extensivo de genes de evasión inmunitaria codificados por este virus (Hansen, S.G., Powers, C.J., Richards, R., Ventura, A.B., Ford, J.C., Siess, D., Axthelm, M.K., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., Picker, L.J., *et al.* 2010. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* 328: 102-106). Otra ventaja adicional de vectores basados en CMV es el potencial para insertar casetes grandes que expresan antígenos de VIS/VIH en los que teóricamente más de 50 kB del genoma vírica puede reemplazarse con ADN ajeno. Juntas, estas características de vectores de vacuna basados en CMV han permitido el desarrollo de una vacuna de CMVRh/VIS que es capaz de inducir una respuesta de T_{EM} robusta a múltiples antígenos del VIS y controlar completamente la replicación vírica en MR expuestos a VIS por vía mucosa antes del establecimiento de infección progresiva, sistémica: un logro que no se ha conseguido con enfoques de vacuna previos.

El vector de CMVRh/VIS puede ser una vacuna de VIS eficaz pero el mayor problema del uso de un CMVH competente de replicación completa como un vector de vacuna de VIH es el de seguridad. Ya que CMV establece una infección crónica del hospedador, la ventana para realización de cualquier potencial patógeno de una vacuna basada en CMV se extiende desde el momento de la vacunación durante toda la vida del individuo. Durante esta ventana (potencialmente >80 años) se espera que algunas vacunas encuentren periodos de supresión inmunitaria, sea como consecuencia de acondicionamiento inmunitario yatrógeno antes del trasplante, o sea como una consecuencia de la enfermedad, como con infección por VIH o cáncer. CMVH también se disemina con frecuencia a la saliva, la orina y leche materna de individuos infectados por CMV sanos durante periodos de tiempo que varían de meses a años. Este potencial de la propagación de vacuna de individuos vacunados a no vacunados es una característica de vacunas atenuadas vivas, tales como la vacuna de la polio oral (VPO) (Heymann, D.L., Sutter, R.W., y Aylward, R.B. 2006. A vision of a world without polio: the OPV cessation strategy. *Biologicals* 34: 75-79). Con el claro precedente de la experiencia con la VPO en la Iniciativa de la Erradicación Global de la Polio, un potencial de propagación ambiental plantea un obstáculo importante adicional para el desarrollo de una vacuna de CMVH/VIH. Estas características de CMV deben abordarse antes de que una vacuna basada en CMV sea aceptable para el uso general en la población humana. La solicitud de patente US2008/199493 A1 describe vacunación de Vis y Vih usando Vectores de Vacuna basados en cmvRh y cmvH y proporciona vectores de vacuna basados de CMVRh y CMVH, y versiones de los mismos con medios de suicidio o seguridad. Se menciona un CMVRh/CMVH regulado por tetraciclina. Dicho vector de vacuna de CMVRh/CMVH se construye colocando un gen esencial para la replicación vírica bajo el control del sistema inducible por Tet. Sin embargo, este documento no describe ni sugiere un vector de CMVRh o CMVH recombinante que comprende supresiones en genes que son esenciales para la replicación.

Las realizaciones de esta invención abordan problemas de diseminación vírica y patogenia y se refieren a dos enfoques potencialmente complementarios para generar una vacuna segura y eficaz usando los vectores de CMV. Un enfoque se centra en el desarrollo de vectores de CMV que se propagan completamente o condicionalmente defectuosos o gravemente restringidos en su replicación, pero que siguen siendo capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra un antígeno heterólogo. El segundo enfoque se centra en la generación de vectores de CMV competentes para replicación que son incapaces de infectar células epiteliales, un tipo celular importante para la diseminación vírica, así como un tipo celular principal en el pulmón asociado con neumonía por CMV. Algunas realizaciones de la invención pueden referirse a elementos de seguridad adicionales en estos vectores, incluyendo un bloqueo en la replicación en células neurales y mieloides. El vector de CMV óptimo será incapaz de diseminarse a partir de individuos vacunados, ni provocará enfermedad en fetos o MR adultos inmunocomprometidos, pero aún inducirá una respuesta inmunitaria protectora contra enfermedades infecciosas o tumores. Se desvela en el presente documento la generación de un candidato a vacuna del VIH basada en CMVH que será potencialmente altamente eficaz contra infección por VIH, aceptablemente seguro para todas las poblaciones diana humanas, no transmisible entre personas por contacto, y por lo tanto listo para su traslación a ensayos clínicos humanos.

La presente invención se refiere a vectores recombinantes de CMVH y CMVRh que codifican antígenos heterólogos que inducen y mantienen un alto nivel celular y respuestas inmunitarias humorales específicas para el antígeno codificado. La presente invención también se refiere a vacunas de CMV atenuadas que están limitadas en su capacidad para replicar en células y tejidos asociados con transmisión de CMV y enfermedad.

Objetos adicionales de la invención incluyen cualquiera o todos de: proporcionar productos de expresión a partir de dichos recombinantes, métodos para expresar productos a partir de dichos recombinantes, composiciones que contienen los recombinantes o los productos de expresión, métodos para usar los productos de expresión, métodos para usar las composiciones, ADN de los recombinantes y métodos para replicar ADN de los recombinantes.

Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento vectores de CMVRh o CMVH recombinantes que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican antígenos heterólogos. En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es un antígeno específico de patógeno. En otras realizaciones, el antígeno heterólogo es un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, los vectores desvelados incluyen una supresión en uno o más genes de CMV que codifican una proteína inmunomoduladora. En algunas realizaciones, los vectores de CMV desvelados incluyen una supresión en uno o más genes esenciales para replicación de CMV. Se proporcionan además composiciones que comprenden los vectores de CMVRh o CMVH recombinantes y un vehículo farmacéuticamente aceptable así como el uso de dicha composición en el tratamiento de un sujeto.

También se proporciona un método para tratar a un sujeto con una enfermedad infecciosa, o en riesgo de ser infectado con una enfermedad infecciosa, y un método para tratar un sujeto con cáncer, o en riesgo de desarrollar cáncer. Los métodos incluyen seleccionar a un sujeto que necesite el tratamiento y administrar al sujeto un vector de CMVRh o CMVH recombinante que codifique un antígeno heterólogo o una composición del mismo.

Se proporcionan además vectores de CMVRh o CMVH recombinantes que incluyen una supresión en uno o más genes de CMVRh o CMVH que son esenciales para o aumentan la replicación. En algunas realizaciones, al menos un gen esencial o de aumento es UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44, o un homólogo de los mismos. En algunas realizaciones, los vectores de CMVRh o CMVH recombinantes incluyen además un antígeno heterólogo, tal como un antígeno específico de patógeno o un antígeno tumoral. Los vectores de CMVRh o CMVH recombinantes que tienen una supresión en un gen esencial y que codifican un antígeno heterólogo pueden usarse, por ejemplo, como vacunas para el tratamiento de enfermedad infecciosa o cáncer. En ausencia de un antígeno heterólogo, los vectores de CMVRh y CMVH recombinantes que tienen una supresión en un gen esencial pueden usarse, por ejemplo, para vacunación contra CMVH.

Se proporcionan además vacunas de virus atenuados que son incapaces de replicar en células y tejidos asociados con transmisión y enfermedad de CMV. Los vectores de CMVRh/VIS vivos con un fondo genético tipo casi silvestre proporcionan una vacuna eficaz que induce inmunidad protectora contra el VIS en macacos rhesus. Para que una vacuna de CMV humano (CVMH)/VIH sea segura para todos los sujetos potenciales en una población general, incluyendo individuos inesperadamente inmunocomprometidos, es necesario que el vector de vacuna de CMV se atenúe sin perder la capacidad para inducir inmunidad protectora. CMV puede replicar en una amplia diversidad de células y tejidos en el hospedador, incluyendo: neuronas en el sistema nervioso central (SNC), células epiteliales, hepatocitos, pulmón y riñón. Las células mieloides y endoteliales se consideran sitios persistentes para CMV en el hospedador. Durante la enfermedad de CMV manifiesta en individuos inmunocomprometidos, la infección directa que da como resultado destrucción de células epiteliales y endoteliales en el pulmón, el hígado y la retina es responsable de enfermedad en estos órganos diana. Durante la infección congénita, se cree que la infección por CMV directa de células neuronales explica los déficits auditivos y el retraso mental asociados. Las realizaciones de la invención se refieren a la modulación de la capacidad de CMV para replicar en estos tipos celulares críticos para aumentar la seguridad del vector sin comprometer la eficacia de vacuna, dichos virus atenuados y su uso como vacunas.

Las realizaciones de la invención se refieren a CMVH como un vector para inducir inmunidad protectora frente a VIH, que se basa en la hipótesis altamente innovadora de que una respuesta de linfocitos T de alta frecuencia, desplazada hacia memoria efectora tiene claras ventajas frente a la memoria generada por vacuna convencional en la protección contra infecciones lentivíricas, en combinación con el reconocimiento de que CMVH proporciona exactamente dicha respuesta. Esta característica de CMVH es única para este virus, incluso en comparación con otros virus persistentes tales como virus del herpes simple (VHS) y virus de Epstein-Barr (Asanuma, H., Sharp, M., Maecker, H.T., Maino, V.C., y Arvin, A.M. 2000. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis* 181: 859-866; Harari, A., Vallelain, F., Meylan, P.R., y Pantaleo, G. 2005. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 174: 1037-1045; Harari, A., Enders, F.B., Cellerai, C., Bart, P.A., y Pantaleo, G. 2009. Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J Virol* 83: 2862-2871; Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., et al. 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202: 673-685.).

Incluso aunque CMV es benigno en individuos inmunocompetentes, para extender estos hallazgos a una vacuna de CMVH/VIH para ensayos humanos, es necesario atenuar ciertos aspectos del vector de CMV. Clásicamente, se han generado vacunas víricas atenuadas mediante pase en serie de virus a través de células en cultivo. Este enfoque es tedioso y las pruebas con la vacuna de la polio oral (VPO) enfatizan los problemas de seguridad con respecto a la

reversión de vacunas de virus atenuadas por dicho pase “ciego” a un fenotipo patógeno (Rahimi, P., Tabatabaie, H., Gouya, M.M., Zahraie, M., Mahmudi, M., Ziaie, A., Rad, K.S., Shahmahmudi, S., Musavi, T., Azad, T.M., *et al.* 2007. Characterization of mutations in the VP(1) region of Sabin strain type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis cases in Iran. *J Clin Virol* 39: 304-307; Kew, O., Morris-Glasgow, V., Landaverde, M., Burns, C., Shaw, J., Garib, Z., Andre, J., Blackman, E., Freeman, C.J., Jorba, J., *et al.* 2002. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine derived poliovirus. *Science* 296: 356-359.).

Se generaron vacunas atenuadas vivas tempranas para CMVH hace más de 30 años mediante pase en serie de virus en cultivo tisular. Estas vacunas de CMVH se ensayaron en voluntarios humanos y pacientes de trasplante (Quinnan, G.V., Jr., Delery, M., Rook, A.H., Frederick, W.R., Epstein, J.S., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Ramsey, K.M., Mittal, K., Plotkin, S.A., *et al.* 1984. Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med* 101:478-483; Plotkin, S.A., Smiley, M.L., Friedman, H.M., Starr, S.E., Fleisher, G.R., Wlodaver, C., Dafoe, D.C., Friedman, A.D., Grossman, R.A., y Barker, C.F. 1984. Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet* 1: 528-530; Plotkin, S.A., Starr, S.E., Friedman, H.M., Gonczol, E., y Weibel, R.E. 1989. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J Infect Dis* 159: 860-865).

Aunque la vacuna de CMVH puede considerarse segura, sigue habiendo preocupación con respecto a la patogenia así como la capacidad del virus para propagarse a individuos seronegativos no vacunados. La capacidad de diseñar racionalmente una vacuna del CMVH que sea menos patógena y no se disemine al ambiente está ahora disponible con la aparición de adelantos tecnológicos para clonar y manipular genéticamente CMV, con un objetivo a lo largo plazo de generar un vector de vacuna de CMV que codifica antígenos de VIH que sea seguro e incapaz de propagarse a otros individuos. Las realizaciones de la presente invención se refieren al diseño racional y uso de las últimas técnicas genéticas bacterianas para generar un vector basado en CMV que tenga un tropismo restringido para células implicadas en la propagación así como una capacidad alterada para replicar en tejidos asociados con enfermedad de CMV tanto adulta como congénita.

Una realización de la invención se refiere a la alteración del tropismo celular del vector de CMV para prevenir la infección de tipos celulares específicos implicados en el daño tisular potencial y/o diseminación a la orina o secreciones. El CMV es capaz de infectar una amplia diversidad de células en el hospedador, incluyendo: células epiteliales en el intestino, el riñón, el pulmón y la retina, células neuronales en el SNC, hepatocitos, así como células endoteliales y células de linaje mieloide que se consideran sitios persistentes del virus (Dankner, W.M., McCutchan, J.A., Richman, D.D., Hirata, K., y Spector, S.A. 1990. Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J Infect Dis* 161: 31-36; Einhorn, L., y Ost, A. 1984. Cytomegalovirus infection of human blood cells. *J Infect Dis* 149: 207-214; Gnann, J.W., Jr., Ahlmen, J., Svalander, C., Olding, L., Oldstone, M.B., y Nelson, J.A. 1988. Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. *Am J Pathol* 132: 239-248; Howell, C.L., Miller, M.J., y Martin, W.J. 1979. Comparison of rates of virus isolation from leukocyte populations separated from blood by conventional and Ficoll-Paque/Macrodex methods. *J Clin Microbiol* 10: 533-537; Myerson, D., Hackman, R.C., Nelson, J.A., Ward, D.C., y McDougall, J.K. 1984. Wide-spread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum Pathol* 15: 430-439; Schrier, R.D., Nelson, J.A., y Oldstone, M.B. 1985. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 230: 1048-1051; Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., y Jahn, G. 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76: 741-750.).

CMVH codifica >200 genes y varios de los genes que son prescindibles para la replicación de virus básica se han identificado como determinantes del tropismo que permiten que el virus entre y se replique en macrófagos, células endoteliales y células epiteliales. Se ha mostrado que un locus de genes de CMVH, UL128-131A, es esencial para la entrada en células endoteliales y epiteliales (Gerna, G., Percivalle, E., Lilleri, D., Lozza, L., Fornara, C., Hahn, G., Baldanti, F., y Revello, M.G. 2005. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol* 86:275-284; Hahn, G., Revello, M.G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanesi, G., Koszinowski, U., *et al.* 2004. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol* 78: 10023-10033; Wang, D., y Shenk, T. 2005. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol* 79: 10330-10338; Wang, D., y Shenk, T. 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18153-18158; Ryckman, B.J., Rainish, B.L., Chase, M.C., Borton, J.A., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., y Johnson, D.C. 2008. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol* 82: 60-70; Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A., y Johnson, D.C. 2006. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* 80: 710-722.).

Los homólogos de CMVRh para UL128 y 130 de CMVH están inactivados en la cepa de CMVRh 68-1 usada como el vector base para los estudios de CMVRh/VIS de los inventores (Lilja, A.E., y Shenk, T. 2008. Efficient replication of rhesus cytomegalovirus variants in multiple rhesus and human cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19950-19955). Resulta interesante que CMVRh 68-1 aún crece en células endoteliales y epiteliales (aunque a una tasa

reducida en comparación con el virus CMVRh de bajo pase con UL128/130 intacto) (Lilja, A.E., Chang, W.L., Barry, P.A., Becerra, S.P., y Shenk, T.E. 2008. Functional genetic analysis of rhesus cytomegalovirus: Rh01 is an epithelial cell tropism factor. *J Virol* 82: 2170-2181; Rue, C.A., Jarvis, M.A., Knoche, A.J., Meyers, H.L., DeFilippis, V.R., Hansen, S.G., Wagner, M., Fruh, K., Anders, D.G., Wong, S.W., *et al.* 2004. A cyclooxygenase-2 homologue encoded by rhesus cytomegalovirus is a determinant for endothelial cell tropism. *Journal of Virology* 78: 12529-12536.), pero muestra propagación reducida en comparación con CMVRh de bajo pase lo que sugieren que la reducción del tropismo a células epiteliales/endoteliales pueda atenuar el virus. El análisis mutacional de CMVRh 68-1 ha identificado otros 4 genes de CMVRh [Rh01 (CMVH TLR1), Rh159 (CMVH UL148), Rh160 (UL132) y Rh203 (CMVHUS22)] que también se requieren para tropismo de células epiteliales. Las realizaciones de la invención se refieren a la mutación del resto de estos genes de tropismo a células epiteliales para reducir en gran medida, si no anular, la capacidad del CMV para infectar células epiteliales, evitando de este modo su capacidad para diseminarse a orina o secreciones glandulares (es decir, saliva y leche materna), pero probablemente no compromete la capacidad de un vector de CMV para inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a VIH/VIS.

Además, ya que la infección por CMV de células epiteliales en el pulmón y la retina da como resultado neumonía y retinitis, respectivamente, la eliminación de todos los genes de tropismo a células epiteliales del CMV puede reducir significativamente el potencial patógeno del vector resultante. Aspectos de la invención se refieren a este enfoque altamente dirigido e innovador que potenciará significativamente tanto la seguridad del vector de CMVRh/CMVH para su uso como una vacuna de VIS/VIH, así como evitar la diseminación y la potencial propagación del vector de vacuna a la población no vacunada.

Realizaciones adicionales se refieren a aprovechar la expresión específica de tejido de microARN (miARN) celulares para atenuar el virus en tejidos asociados con enfermedad en infección adulta y congénita. Los miARN son ARN de 21-22 pb pequeños no codificantes que están altamente conservados y expresados en todas las células animales de drosófila a seres humanos y por lo tanto MR (Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297). Los miARN son un sistema antiguo para regulación postranscripcional que están implicados en una amplia serie de procesos biológicos y regulan la expresión génica uniéndose con secuencias diana en la 3' UTR de ARNm provocando la inhibición de la traducción de desestabilización del ARNm (Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233). Estas especies de ARN también están codificadas en virus de ADN tales como CMV y la expresión y función de estos miARN se caracteriza como se describe en Dunn, W., Trang, P., Zhong, Q., Yang, E., van Belle, C., y Liu, F. 2005. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol* 7: 1684-1695; Grey, F., Antoniewicz, A., Allen, E., Saugstad, J., McShea, A., Carrington, J.C., y Nelson, J. 2005. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol* 79: 12095-12099; Grey, F., Meyers, H., White, E.A., Spector, D.H., y Nelson, J. 2007. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog* 3:e163 y Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., *et al.* 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2: 269-276.

Los miARN de mamífero pueden expresarse de forma ubicua en todos los tejidos del hospedador, expresarse solamente durante ciertos momentos durante la embriogénesis en la que estas especies de miARN desempeñan un papel importante en los procesos de desarrollo o pueden expresarse solamente de una manera específica de tejido (tal como miR-142-3p en células de linaje mieloide, miR-124 en tejido del SNC y miR-122 en hígado) (Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccarini, A., Lazzari, G., Galli, C., y Naldini, L. 2007. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* 25: 1457-1467; Barnes, D., Kunitomi, M., Vignuzzi, M., Saksela, K., y Andino, R. 2008. Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines. *Cell Host Microbe* 4: 239-248; Lee, C.Y., Rennie, P.S., y Jia, W.W. 2009. MicroRNA regulation of oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 15: 5126-5135; Perez, J.T., Pham, A.M., Lorini, M.H., Chua, M.A., Steel, J., y tenOever, B.R. 2009. MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus. *Nat Biotechnol* 27: 572-576.).

La expresión específica de tejido de miARN se aprovecha para generar una vacuna de la polio atenuada mediante la introducción de múltiples secuencias diana de miARN de miR-124 que se expresa específicamente en el SNC en la 3'UTR del genoma de poliovirus (Barnes, D., Kunitomi, M., Vignuzzi, M., Saksela, K., y Andino, R. 2008. Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines. *Cell Host Microbe* 4: 239-248). Se ha observado que la adición de las secuencias diana de miR-124 al genoma de poliovirus atenúa significativamente la infección vírica en ratones. De forma similar, se añadieron múltiples secuencias diana de miR-93 que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos de mamífero pero no aviares al gen de nucleoproteína de la gripe que da como resultado un mutante de gripe restringido a especie que fue capaz de crecer en huecos de pollo pero no en ratones (Perez, J.T., Pham, A.M., Lorini, M.H., Chua, M.A., Steel, J., y tenOever, B.R. 2009. MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus. *Nat Biotechnol* 27: 572-576).

Las realizaciones de la presente invención se refieren a este enfoque de atenuación que es eficaz para virus mayores, tales como CMV murino (CMVM). A diferencia de los virus de ARN pequeños, el CMV codifica más de 200 genes de los que aproximadamente el 50 % son esenciales y necesarios para la replicación o codifican proteínas

estructurales del virus. Uno de estos genes de CMV esenciales es el gen inmediato temprano (IE) 3 (el equivalente de ratón de IE2 en CMVH o CMVRh) que codifica una proteína reguladora de la transcripción necesaria para activación posterior de genes tempranos y tardíos en el virus. La supresión de este gen bloquea completamente la replicación vírica de células y tejidos de ratón (Angulo, A., Ghazal, P., y Messerle, M. 2000. The major immediate early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J Virol* 74: 11129-11136). Se describe en el presente documento que la introducción de secuencias diana de miARN específicos de tejido en la 3'UTR de este gen atenuaría la replicación vírica en estas células.

Una realización adicional se refiere a secuencias dianas de miR-142-3p que se expresa solamente en células de linaje mieloide (Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccarini, A., Lazzari, G., Galli, C., y Naldini, L. 2007. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* 25: 1457-1467). Se ha mostrado que células de linaje mieloide representan un depósito de virus latentes, y se cree que albergan y diseminan virus por todo el hospedador (Jarvis, M.A., y Nelson, J.A. 2002. Mechanisms of human cytomegalovirus persistence and latency. *Front Biosci* 7: d1575-1582). Estudios adicionales con CMVM (Snyder, C.M., Allan, J.E., Bonnett, E.L., Doom, C.M., y Hill, A.B. Cross-presentation of a spread-defective MCMV is sufficient to prime the majority of virus-specific CD8+ T cells. *PLoS One* 5:e9681) indican que la sensibilización cruzada es el mecanismo primario por el que las proteínas codificadas por CMV preparan la respuesta inmunitaria, la replicación en células dendríticas mieloides puede tener una influencia sorprendentemente mínima en la inmunogenia del CMV.

Se usa tecnología basada en cromosoma artificial de bacterias (BAC) para generar un virus CMVM recombinante que contiene cuatro secuencias diana repetidas (cuatro 21meros) con complementariedad exacta con el miARN celular, miR-142-3p, dentro de la 3'UTR del gen vírico esencial IE3 (IE3-142). Para confirmar la medida en que la expresión de miR-142-3p podría reprimir la replicación de IE3-142, se realizan ensayos de crecimiento de virus en la línea celular de macrófago, IC-21. El análisis por RT-PCR confirmó que las células IC-21 expresan altos niveles de miR-142-3p (FIG. 21) lo que hace a la línea celular adecuada para ensayar la eficacia de la estrategia. Los experimentos preliminares confirmaron la utilidad del enfoque para atenuación específica de tipo celular de CMV. Aunque IE3-142 se replicó a niveles de tipo silvestre en fibroblastos, el crecimiento se bloqueó completamente en macrófagos IC-21 (FIGs. 22 y 23). Un virus de control, IE3-015, que contiene solamente secuencia de vector dentro del sitio de inserción de IE3, se replica hasta niveles de tipo silvestre en células IC-21. El análisis por RT-PCR indica que la expresión de IE3 se anuló completamente después de infección de células IC-21, pero no después de la infección de fibroblastos (que carecen de expresión de miR-142-3p) lo que indica que la alteración de la expresión de IE3 no se debe a la inserción de la secuencia diana.

Las realizaciones de la invención se refieren a la estrategia para atenuar CMV basándose en la demostración de que los virus pueden atenuarse con respecto al crecimiento específico tisular usando secuencias diana de miARN y la atenuación de CMVM en células mieloides mediante la dirección de miARN específico de células a genes víricos esenciales. Ya que el SNC es una diana principal para la patogenia de CMV en enfermedad tanto congénita como de adultos, se generan vacunas de CMVRh/VIS y CMVH/VIH que contienen secuencias diana de miARN altamente conservados específicamente expresados por neuronas fusionadas con genes de CMV esenciales para evitar la replicación en el SNC. También se usan secuencias diana del miARN mieloide miR-124 para prevenir la replicación y diseminación del vector de CMV en este tipo celular. Juntos, estos virus atenuados proporcionarán un nivel adicional de seguridad que permitirá el uso de esta vacuna en todas las poblaciones diana humanas.

Además de la aplicación a la traducción del uso de expresión específica de tejido de miARN para generar vectores de CMV seguros, están disponibles por primera vez herramientas para plantear cuestiones científicas importantes, más notablemente incluyendo la determinación de qué tipos celulares se requieren para el establecimiento y la persistencia de infección por CMV, inducción de la inmunidad de linfocitos T y enfermedad como se describe en el presente documento. Las realizaciones de la invención se refieren a la infección de tipos celulares particulares que pueden ser cruciales para la generación de la inmunidad de linfocitos T sesgada a T_{EM} de alta frecuencia característica de respuestas inducidas por CMV, y la determinación de cómo la restricción del tropismo vírico cambia el carácter de la enfermedad por CMV.

Algunas abreviaturas no limitantes incluyen:

BAC	cromosoma artificial bacteriano
BAL	lavado broncoalveolar
CM	memoria central
CMV	citomegalovirus
CytoG	gen citotóxico
Dox	doxiciclina
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EM	memoria efectora
CMVH	citomegalovirus humano
VHC	virus de la hepatitis C
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana

	TCI	tinción de citocinas intracelular
	i.p.	intraperitoneal
	CMVM	citomegalovirus murino
	MEF	fibroblasto embrionario murino
5	MOI	multiplicidad de infección
	PNH	primate no humano
	NP	nucleoproteína
	NE	no estructural
	ORF	fase abierta de lectura
10	SP	sangre periférica
	PBMC	células mononucleares de sangre periférica
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	UFP	unidad formadora de placas
	CMVRh	citomegalovirus de rhesus
15	MR	macaco rhesus
	s.c.	subcutáneo
	VIS	virus de la inmunodeficiencia de simios
	Tet	tetraciclina
20	WT	tipo silvestre

A no ser que se indique de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos habituales en la biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la invención, puede usarse la siguiente terminología:

Ayudante: una sustancia o un vehículo que potencia de forma no específica la respuesta inmunitaria a un antígeno u otra composición. Los adyuvantes pueden incluir una suspensión de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato) en la que se adsorbe el antígeno; o emulsión de agua en aceite en la que la solución de antígeno se emulsiona en aceite mineral (por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund), en ocasiones con inclusión de micobacterias muertas (adyuvante completo de Freund) para potenciar adicionalmente la antigenicidad. También pueden usarse oligonucleótidos inmunoestimulantes (tales como los que incluyen un motivo de CpG) como adyuvantes (por ejemplo, véase Patentes de Estados Unidos N.º 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; 6.339.068; 6.406.705; y 6.429.199). Los adyuvantes también incluyen moléculas biológicas tales como moléculas coestimulantes. Los adyuvantes biológicos ejemplares incluyen IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L y 41 BBL.

Administración: la introducción de una composición en un sujeto por una vía seleccionada. Por ejemplo, si la vía seleccionada es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición en una vena del sujeto. La administración puede ser local o sistémica. Los ejemplos de administración local incluyen, pero sin limitación, administración tópica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intratecal, administración intrapericárdica, administración intraocular, administración oftálmica tópica o administración a la mucosa nasal o los pulmones por administración de inhalación. La administración sistémica incluye cualquier vía de administración para distribuir un compuesto activo o una composición ampliamente por todo el cuerpo mediante el sistema circulatorio. Por lo tanto, la administración sistémica incluye, pero sin limitación, administración intraperitoneal, intra-arterial e intravenosa. La administración sistémica también incluye, pero sin limitación, administración tópica, administración subcutánea, administración intramuscular o administración por inhalación, cuando dicha administración se dirige a la absorción y distribución por todo el cuerpo por el sistema circulatorio.

Animal: un organismo vertebrado o invertebrado multicelular vivo, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto seres humanos como mamíferos no humanos. El término "primate" incluye tanto seres humanos como primates no humanos. Los "primates no humanos" son simios tales como monos, chimpancés, orangutanes, babuinos y macacos. De forma similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, tales como primates no humanos.

Anticuerpo: los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con un antígeno. Un anticuerpo de origen natural (por ejemplo, IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Sin embargo, se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de origen natural. Por lo tanto, también se pretende que estos fragmentos de unión a antígeno se designen por el término "anticuerpo". Los ejemplos no limitantes, específicos, de fragmentos de unión abarcados dentro del término anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una única rama de un anticuerpo, (iv) un fragmento de dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546, 1989) que consiste en un dominio VH; (v) una región determinante de

complementariedad (CDR) aislada; y (vi) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra.

Antígeno: Un compuesto, una composición o una sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o son absorbidas en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluyendo los inducidos por inmunógenos heterólogos. El término "antígeno" incluye todos los epítomos antigénicos relacionados. "Epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. En una realización, los linfocitos T responden al epítopo, cuando el epítopo se presenta junto con una molécula de MHC. Pueden formarse epítomos a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente tras la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9 o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos de determinación de la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional.

En algunas realizaciones, un antígeno es un polipéptido expresado específicamente en células tumorales (es decir, un antígeno tumoral). En algunos casos, también se expresan antígenos tumorales en células normales, pero el nivel de expresión en células normales es significativamente menor que el nivel de expresión en células tumorales. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno específico de patógeno. En el contexto de la presente divulgación, un antígeno específico de patógeno es un antígeno que induce una respuesta inmunitaria contra el patógeno y/o es único de un patógeno (tal como un virus, una bacteria, un hongo o un protozoo).

Fragmento antigénico: se refiere a cualquier parte de una proteína de polipéptido que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Linfocito T específico de antígeno: un linfocito CD8⁺ o CD4⁺ que reconoce un antígeno particular. En general, los linfocitos T específicos de antígeno se unen específicamente con un antígeno particular presentado por moléculas del MHC, pero no otros antígenos presentados por el mismo MHC.

Atenuado: en el contexto de un virus vivo, el virus está atenuado si su capacidad para infectar una célula o un sujeto y/o su capacidad para producir enfermedad está reducida (por ejemplo, eliminada) en comparación con un virus de tipo silvestre. Típicamente, un virus atenuado conserva al menos alguna capacidad de inducir una respuesta inmunitaria después de la administración a un sujeto inmunocompetente. En algunos casos, un virus atenuado es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora sin provocar ninguna señal o síntoma de infección. En algunas realizaciones, la capacidad de un virus atenuado para provocar enfermedad en un sujeto se reduce al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 % o al menos aproximadamente 90 % en relación con un virus de tipo silvestre.

Cáncer, tumor, neoplasia y trastorno maligno: una neoplasia es un crecimiento anómalo de tejido o células que resultan de división celular excesiva. El crecimiento neoplásico puede producir un tumor. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral" que puede medirse como el número, volumen o peso del tumor. Un tumor que no metastatiza se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede metastatizar se denomina "maligno". Los tumores malignos también se denominan "cáncer".

Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia por tricoleucitos y mielodisplasia. En algunos casos, los linfomas se consideran tumores sólidos.

Los tumores sólidos son masas anómalas de tejido que habitualmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Diferentes tipos de tumores sólidos se nombran según el tipo de células que los forman (tales como sarcomas, carcinomas y linfomas). Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, tumor maligno linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de tiroides medular, carcinoma de tiroides papilar, feocromocitomas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, neoplasias infectadas por virus del papiloma humano (VPH), adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer del cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de la vejiga, melanoma y tumores del SNC (tales como un glioma (tal como glioma del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme),

astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, craneofaringioma Schwannoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebral).

5 CMV (citomegalovirus): un miembro de la subclase beta de la familia de herpesvirus. CMV es un virus de ADN bicatenario, grande (genoma de 230 kB), con variantes específicas de rango de hospedadores tales como CMVM (CMV murino), CMVRh (CMV de rhesus) y CMVh (CMV humano). En el contexto de la presente invención, "CMVRh" se refiere a cualquier cepa, aislado o variante de CMV de rhesus. En ejemplos particulares, CMVRh comprende la
10 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Como se usa en el presente documento "CMVh" incluye cualquier cepa, aislado o variante de CMV humano. En ejemplos particulares, CMVh comprende las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2-9, o una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 2-9.

15 Quimioterapia: en el tratamiento de cáncer, la quimioterapia se refiere a la administración de uno o más agentes para destruir o ralentizar la reproducción de células que se multiplican rápidamente, tales como células tumorales o cancerosas. En un ejemplo particular, la quimioterapia se refiere a la administración de uno o más agentes antineoplásicos para reducir significativamente el número de células tumorales en el sujeto, tal como en al menos 50 %.

20 Agente quimioterapéutico: un agente con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular anómalo o hiperplasia. Dichas enfermedades incluyen cáncer, enfermedad autoinmunitaria así como enfermedades caracterizadas por crecimiento hiperplásico tales como psoriasis. Un experto habitual en la materia puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico (por ejemplo, véase Slapak y Kufe, Principles of Cancer Therapy, Capítulo 86 en Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry *et al.*, Chemotherapy, C. 17 en Abeloff, Clinical Oncology 2ª ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knopf MF, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993).

30 Reducir o agotar: reducir la calidad, cantidad o fuerza de algo. En un ejemplo, una terapia (tal como los métodos proporcionados en el presente documento) reduce un tumor (tal como el tamaño de un tumor, el número de tumores, la metástasis de un tumor, la reaparición de un tumor o combinaciones de los mismos), o uno o más síntomas asociados con un tumor, por ejemplo en comparación con la respuesta en ausencia de la terapia. En un ejemplo particular, una terapia reduce el tamaño de un tumor, el número de tumores, la metástasis de un tumor, la
35 reaparición de un tumor o combinaciones de los mismos, después de la terapia, tal como una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 % o incluso al menos 90 %. De forma similar, en otras realizaciones, una terapia reduce la carga infecciosa o el título de un patógeno, o uno o más síntomas asociados con la infección.

40 Supresión: la retirada de una secuencia de ADN, uniéndose las regiones en ambos lados de la secuencia retirada entre sí.

Cantidad eficaz: una cantidad suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que se trata. Una cantidad eficaz de una composición, tal como una vacuna, puede administrarse en una única dosis, o en varias dosis, durante un ciclo de tratamiento. Sin embargo, la cantidad eficaz del compuesto dependerá del compuesto aplicado, el sujeto que se trate, la gravedad y el tipo de la afección, y la manera de administración del compuesto.

50 Epítipo: un epítipo de interés es un antígeno o inmunógeno o fragmento inmunológicamente activo del mismo de un patógeno o toxina de interés veterinario o humano. Un epítipo de interés puede ser un antígeno de patógeno o toxina, o de un antígeno de un patógeno o toxina, u otro antígeno o toxina que induce una respuesta con respecto al patógeno, de otro antígeno o toxina que induce una respuesta con respecto al patógeno.

Expresión: traducción de un ácido nucleico en una proteína, por ejemplo la traducción de un ARNm que codifica un antígeno específico de tumor o específico de patógeno a una proteína.

55 Secuencias de control de la expresión: secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la que se une operativamente, por ejemplo la expresión de un polinucleótido heterólogo cortado y empalmado en un genoma de CMV y que codifica una proteína antigénica unida operativamente con secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión se unen operativamente con una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y,
60 según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (ATG) delante de un gen codificante de proteína, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento de la fase de lectura correcta de ese gen para permitir la traducción apropiada de ARNm y codones de terminación apropiados. Se pretende que la expresión "secuencias de control" incluya, como mínimo, componentes cuya presencia pueda influir en la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo,
65 secuencias líderes y secuencias compañeras de fusión. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un

promotor.

Un promotor es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen los elementos promotores que son suficientes para hacer la expresión génica dependiente de promotor controlable para especificidad de tipo celular, especificidad tisular o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden localizarse en regiones 5' o 3' del gen. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase por ejemplo, Bitter *et al.*, Methods in Enzymology 153: 516-544, 1987). Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL de bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-lac) y similares. En una realización, cuando se clonan en sistemas celulares de mamífero, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamífero (tales como promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (tales como la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K de virus vaccinia). También pueden usarse promotores producidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas para proporcionar transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

Un polinucleótido puede insertarse en un vector de expresión, incluyendo un vector vírico, que contiene una secuencia promotora, que facilita la transcripción eficaz de la secuencia genética insertada del hospedador. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

Heterólogo: un polipéptido heterólogo (tal como un antígeno heterólogo) o polinucleótido heterólogo se refiere a una polipéptido o polinucleótido derivado de una fuente o especie diferente. En algunas realizaciones en el presente documento, la secuencia heteróloga es de una fuente genética diferente, tal como un virus u otro organismo, que la segunda secuencia. En ejemplos particulares, la secuencia heteróloga es una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral o un antígeno específico de patógeno.

Péptido inmunogénico (o antigénico): un péptido que comprende un motivo específico de alelo u otra secuencia, tal como una repetición N terminal, de modo que el péptido se una con una molécula del MCH e induzca una respuesta de linfocitos T citotóxicos ("CTL") o una respuesta de linfocitos B (por ejemplo producción de anticuerpos) contra el antígeno del que deriva el péptido inmunogénico. En una realización, se identifican péptidos inmunogénicos usando motivos de secuencia u otros métodos, tales como red neuronal o determinaciones polinominales conocidas en la técnica. Típicamente, se usan algoritmos para determinar el "umbral de unión" de péptidos para seleccionar los que tienen puntuaciones que les proporcionan una alta probabilidad de unión con una cierta afinidad y serán inmunogénicos. Los algoritmos se basan en los efectos sobre la unión del MHC de un aminoácido particular en una posición particular, los efectos en la unión de anticuerpo de un aminoácido particular en una posición particular, o los efectos en la unión de un sustitución particular en un péptido que contiene motivo. Dentro del contexto de un péptido inmunogénico, un "resto conservado" es uno que aparece en una frecuencia significativamente mayor de lo que se esperaría por distribución aleatoria en una posición particular en un péptido. En una realización, un resto conservado es uno en el que la estructura del MHC puede proporcionar un punto de contacto con el péptido inmunogénico.

Respuesta inmunitaria: un cambio en la inmunidad, por ejemplo una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, macrófago, monocito o polimorfonucleocito, a un agente inmunogénico en un sujeto. La respuesta puede ser específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En un ejemplo particular, una respuesta inmunitaria es una respuesta de linfocitos T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. En otro ejemplo, la respuesta es una respuesta de linfocitos B y da como resultado la producción de anticuerpos específicos para el agente inmunogénico. En algunos ejemplos, dicha respuesta inmunitaria proporciona protección para el sujeto del agente inmunogénico o la fuente del agente inmunogénico. Por ejemplo, la respuesta puede tratar a un sujeto que tiene un tumor, por ejemplo, interfiriendo con la metástasis del tumor o reduciendo el número o tamaño de un tumor. En otro ejemplo, la respuesta inmunitaria puede tratar a un sujeto con una enfermedad infecciosa. Una respuesta inmunitaria puede ser activa e implicar la estimulación del sistema inmunitario del sujeto, o ser una respuesta que resulta de inmunidad adquirida de forma pasiva. Una respuesta inmunitaria "estimulada de forma repetida" es una respuesta inmunitaria a largo plazo que resulta de la estimulación periódica y repetitiva del sistema inmunitario por la producción repetida de un antígeno dentro de un hospedador. En algunos ejemplos, una respuesta inmunitaria aumentada o potenciada es un aumento en la capacidad de un sujeto para combatir una enfermedad, tal como un tumor o una enfermedad infecciosa.

Inmunidad: el estado de poder montar una respuesta protectora tras exposición a un agente inmunogénico. Las respuestas protectoras pueden ser mediadas por anticuerpos o mediadas por células inmunitarias, y pueden dirigirse hacia un patógeno o antígeno tumoral particular. La inmunidad puede adquirirse de forma activa (tal como por exposición a un agente inmunogénico, bien de forma natural o bien en una composición farmacéutica) o de forma pasiva (tal como mediante administración de anticuerpos o linfocitos T estimulados y expandidos *in vitro*). En algunas realizaciones desveladas en el presente documento, la inmunidad se adquiere por administración (tal como por administración intraperitoneal o intravenosa) de un vector de CMV recombinante que expresa un antígeno particular, tal como un antígeno específico de patógeno o un antígeno tumoral.

Enfermedad infecciosa: una enfermedad provocada por un patógeno, tal como un hongo, parásito, protozoo,

bacteria o virus.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: inhibición del desarrollo completo o reaparición de una enfermedad o afección. El "tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que alivia una señal o un síntoma de una enfermedad o afección patológica después de haber comenzado a desarrollarse. El término "aliviar", en referencia a una enfermedad o afección patológica, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede demostrarse, por ejemplo, por una aparición o reparación retardada de síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos de los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una reducción en el número de metástasis (sin la enfermedad es cáncer), una reducción en el título de un patógeno (si la enfermedad es una enfermedad infecciosa), una mejora en la salud general o el bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos para la enfermedad particular. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra señales de una enfermedad o muestra solamente señales tempranas para el fin de reducir el riesgo de desarrollar patología.

Aislado o de origen no natural. Un componente biológico "aislado" o "de origen no natural" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína u orgánulo) se ha separado o purificado sustancialmente de al menos otro componente biológico en la célula del organismo en el que el componente aparece de forma natural, por ejemplo, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que son "de origen no natural" o se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados por métodos de purificación convencionales. La expresión también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora así como ácidos nucleicos sintetizados de forma química.

Unido operativamente: una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en la misma fase de lectura.

Fase abierta de lectura (ORF): una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación interno. Estas secuencias son habitualmente traducibles a un péptido.

Patógeno: un agente biológico que provoca enfermedad o dolencia a su hospedador. Los patógenos incluyen, por ejemplo, bacterias, virus, hongos y protozoos. Los patógenos también se denominan agentes infecciosos.

Los ejemplos de virus patógenos incluyen, pero sin limitación, los que están en las siguientes familias de virus: Retroviridae (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de leucemia de linfocitos T humana; Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C, enterovirus, virus coxsackie humanos, rinovirus, echovirus, virus de la fiebre aftosa); Caliciviridae (tales como cepas que provocan gastroenteritis, incluyendo virus de Norwalk); Togaviridae (por ejemplo, alfavirus (incluyendo virus de chikungunya, virus de la encefalitis equina, virus del bosque de Semliki, virus de Sindbis, virus del Río Ross), virus de la rubeola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis japonesa, virus Powassan y otros virus de encefalitis); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus, virus del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del Ébola, virus de Marburg); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); Bunyaviridae (por ejemplo, virus de Hantaan, virus Sin Nombre, virus de la fiebre del Valle del Rift, bunyavirus, flebovirus y Nairovirus); Arenaviridae (tales como virus de la fiebre de Lassa y otros virus de fiebre hemorrágica, virus Machupo, virus de Junín); Reoviridae (por ejemplo, reoviruses, orbivirus, rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma, virus BK); Adenoviridae (adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (VHS)-1 y VHS-2; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr; virus de la varicela zóster; y otros virus del herpes, incluyendo VHS-6); Poxviridae (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e Iridoviridae (tal como virus de la fiebre porcina africana); Astroviridae; y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B).

Los ejemplos de patógenos bacterianos incluyen, pero sin limitación: *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (tales como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*,

Treponema pertenue, *Leptospira*, *Bordetella pertussis*, *Shigella flexnerii*, *Shigella dysenteriae* y *Actinomyces israelii*.

Los ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, pero sin limitación, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Los ejemplos de patógenos tales como patógenos parasitarios/protozoarios incluyen, pero sin limitación: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*. La invención se refiere a un parásito que puede ser un organismo u organismos protozoarios que provocan enfermedades que incluyen, pero sin limitación, *Acanthamoeba*, Babesiosis, Balantidiasis, Blastocistosis, Coccidios, Dientamebiasis, Amebiasis, *Giardia*, Isosporiasis, Leishmaniosis, meningoencefalitis amebica primaria (PAM), Malaria, Rhinosporidiosis, Toxoplasmosis – neumonía parasitaria, Trichomoniasis, enfermedad del sueño y enfermedad de Chagas. El parásito puede ser un organismo helminto o gusano u organismos que provocan enfermedades que incluyen, pero sin limitación, Ancilostomiasis/Ancilostoma, Anisakuosis, Ascáride – neumonía parasitaria, Ascáride - Bailisascariasis, Cestodo – infección por cestodo, Clonorchiasis, infección por *Dioctophyme renale*, Difilobotriasis – cestodo, gusano de Guinea - Dracunculiasis, Equinococosis - cestodo, gusano alfiler - Enterobiasis, duela del hígado - Fasciolosis, Fasciolopsiasis – dístoma intestinal, Gnatostomiasis, Himenolepiasis, filariasis por *Loa loa*, tumores de Calabar, Mansoneliasis, Filariasis, Metagonimiasis – duela intestinal, oncocercosis, duela del hígado china, Paragonimiasis, duela pulmonar, esquistosomiasis - bilharzia, bilharziosis o esquistosomiasis (todos los tipos), esquistosomiasis intestinal, esquistosomiasis urinaria, esquistosomiasis por *Schistosoma japonicum*, esquistosomiasis intestinal asiática, Esparganosis, Estrongiloidiasis – neumonía parasitaria, cestodo de la ternera, cestodo del cerdo, Toxocariasis, Triquinosis, dermatitis por esquistosomiasis, tricocéfalo y elefantiasis filariasis linfática. El parásito puede ser un organismo u organismos que provocan enfermedades que incluyen, pero sin limitación, gusano parasitario, Síndrome de Halzoun, Miasis, Nigua, *Dermatobia hominis* y Candirú. El parásito puede ser un ectoparásito u organismos que provocan enfermedades que incluyen, pero sin limitación, Chinche, Piojo - Pediculosis, piojo del cuerpo - Pediculosis, ladilla - Pediculosis, Demodex - Demodicosis, Sarna, mosca carnífera y Cochliomyia.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles con la presente divulgación son convencionales. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, publicado por Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª Edición, 1995, describe composiciones y formulaciones adecuadas para suministro farmacéutico de los nucleótidos y proteínas desveladas en el presente documento.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o extracto de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas para administrar pueden contener cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitano.

Unidades formadoras de placas (UFP): una medida de la dosis o el título del virus, determinada por su capacidad para formar placas en una línea celular permisiva.

Polipéptido: un polímero en que los monómeros son restos de aminoácidos que se unen entre sí mediante enlaces de amida. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, puede usarse el isómero óptico L o el isómero óptico D, prefiriéndose los isómeros L. El término polipéptido o proteína como se usa en el presente documento abarca cualquier secuencia de aminoácidos e incluye secuencias modificadas tales como glucoproteínas. Se pretende específicamente que el término polipéptido abarque proteínas de origen natural, así como las que se producen de forma recombinante o sintética.

La expresión fragmento polipeptídico se refiere a una parte de un polipéptido que muestra al menos un epítipo útil. La expresión "fragmento o fragmentos funcionales de un polipéptido" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que conservan una actividad, o una parte medible de una actividad, del polipéptido del que se obtiene el fragmento. El tamaño de los fragmentos, por ejemplo, puede variar de un fragmento polipeptídico tan pequeño como un epítipo capaz de unirse con una molécula de anticuerpo hasta un polipéptido grande capaz de participar en la inducción característica o la programación de cambios fenotípicos dentro de una célula. Un epítipo es una región de un polipéptido capaz de unirse con una inmunoglobulina generada en respuesta al contacto con un antígeno.

Los expertos habituales en la materia conocen bien tablas de sustituciones de aminoácidos conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se considera que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

- 4) Arginina (R), Lisina (K);
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

5 En algunas circunstancias, las variaciones en la secuencia de ADNc que dan como resultado cambios de aminoácidos bien conservativos o no, se minimizan para conservar la identidad funcional e inmunológica de la proteína codificada. La identidad inmunológica de la proteína puede evaluarse determinando si es reconocida por un anticuerpo; una variante que es reconocida por dicho anticuerpo está inmunológicamente conservada. Cualquier variante de secuencia de ADNc introducirá preferentemente no más de veinte, y preferentemente menos de diez sustituciones de aminoácidos en el polipéptido codificado. Las secuencias de aminoácidos variantes pueden ser, por ejemplo, 80 %, 90 % o incluso 95 % o 98 % idénticas a la secuencia de aminoácidos nativa. Pueden encontrarse programas y algoritmos para determinar el porcentaje de identidad en el sitio web del NCBI.

15 Purificado: El término "purificado" no requiere pureza absoluta; sino que se entiende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de proteína purificada es una en la que la proteína indicada es más pura que la proteína en su ambiente natural dentro de una célula o dentro de una cámara de reacción de producción (según sea apropiado).

20 Recombinante: un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que está hecha por una combinación artificial de dos segmentos de otro modo separados. Esta combinación artificial puede conseguirse por síntesis química o, más habitualmente, por la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

25 Deficiente en replicación: Como se usa en el presente documento, un CMV deficiente en replicación es un virus que una vez que está en una célula hospedadora, no puede experimentar replicación vírica, o está limitado significativamente en su capacidad para replicar su genoma y de este modo producir viriones descendientes. En otros ejemplos, los virus deficientes en replicación son deficientes en diseminación, es decir, son capaces de replicar sus genomas, pero son incapaces de infectar otra célula debido a que no se liberan partículas víricas de la célula infectada o debido a que se liberan partículas víricas no infecciosas. En otros ejemplos, los virus deficientes en replicación son deficientes en propagación, es decir, no se secreta virus infeccioso del hospedador infectado y por lo tanto el virus es incapaz de propagarse de un hospedador a otro. En algunas realizaciones, un CMV deficiente en replicación es un CMV que comprende una supresión en uno o más genes esenciales para replicación vírica ("genes esenciales") o requeridos para replicación óptima ("genes de aumento"). Se han descrito genes esenciales y de aumento de CMV en la técnica y se desvelan en el presente documento. En ejemplos particulares, el gen esencial o de aumento de CMV es UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44 (o el homólogo de CMVRh del mismo).

35 Muestra o muestra biológica: una pieza biológica obtenida de un sujeto, tal como una muestra celular, líquida o tisular. En algunos casos, las muestras biológicas contienen ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm y microARN), proteína o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de muestras incluyen, pero sin limitación, saliva, sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, biopsia tisular, pieza quirúrgica, células (tales como PBMC, glóbulos blancos, linfocitos u otras células del sistema inmunitario) y material de necropsia.

40 Identidad de secuencias: la similitud entre dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácidos se expresa con respecto a la similitud entre las secuencias, indicada de otro modo como identidad de secuencias. La identidad de secuencias se mide frecuentemente con respecto al porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares serán las dos secuencias.

Se conocen bien en la técnica métodos de alineamiento de secuencias para comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981); Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970); Pearson y Lipman (PNAS USA 85: 2444, 1988); Higgins y Sharp (Gene, 73: 237-244, 1988); Higgins y Sharp (CABIOS 5: 151-153, 1989); Corpet *et al.* (Nuc. Acids Res. 16: 10881-10890, 1988); Huang *et al.* (Comp. Appls Biosci. 8: 155-165, 1992); y Pearson *et al.* (Meth. Mol. Biol. 24: 307-31, 1994). Altschul *et al.* (Nature Genet., 6: 119-129, 1994) presenta una consideración detallada de métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología. Las herramientas de alineamiento ALIGN (Myers y Miller, CABIOS 4: 11-17, 1989) o LFASTA (Pearson y Lipman, 1988) pueden usarse para realizar comparaciones de secuencias (Internet Program © 1996, W. R. Pearson y la Universidad de Virginia, fasta20u63 versión 2.0u63, fecha de publicación diciembre de 1996). ALIGN compara secuencias completas entre sí mientras que LFASTA compara regiones de similitud local. Estas herramientas de alineamiento y sus tutoriales respectivos están disponibles en internet en el sitio web del NCSA. Como alternativa, para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, puede emplearse la función de 2 secuencias de Blast usando la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada a parámetros por defecto (coste de existencia de huecos de 11 y un coste de hueco por resto de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (de menos de aproximadamente 30 aminoácidos), el alineamiento debería realizarse usando la función de 2 secuencias de Blast, empleando la matriz PAM30 ajustada a parámetros por defecto (penalizaciones de apertura de hueco de 9, extensión de hueco de 1). El sistema de comparación de secuencias BLAST está disponible, por ejemplo, del sitio web del NCBI; véase también Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990; Gish. y States, Nature Genet. 3: 266-272, 1993; Madden *et al.* Meth. Enzymol.

266: 131-141, 1996; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; y Zhang y Madden, Genome Res. 7: 649-656, 1997.

Los ortólogos de proteínas se caracterizan típicamente por posesión de más de 75 % de identidad de secuencia contada sobre el alineamiento de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de proteína específica usando ALIGN ajustado a parámetros por defecto. Las proteínas con aún mayor similitud con una secuencia de referencia mostrarán aumento de las identidades de porcentaje cuando se evalúen por este método, tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 % o al menos 98 % de identidad de secuencia. Además, la identidad de secuencias puede compararse sobre la longitud completa de dominios particulares de los péptidos desvelados.

Cuando se compare significativamente menos que la secuencia completa para identidad de secuencia, las secuencias homólogas poseerán típicamente al menos 80 % de identidad de secuencia sobre ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencias de al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia sobre dichas ventanas cortas puede determinarse usando LFASTA; se describen métodos en el sitio web de NCSA. Un experto en la materia apreciará que estos intervalos de identidad de secuencias se proporcionan solamente como guía; es completamente posible que puedan obtenerse homólogos fuertemente significativos que quedan fuera de los intervalos proporcionados.

Una indicación alternativa de que dos moléculas de ácido nucleico están estrechamente relacionadas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C a 20 °C menores que el punto de fusión térmico T_m para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones para hibridación de ácidos nucleicos y cálculo de rigurosidades pueden encontrarse en Sambrook *et al.* (En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Tijssen (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Parte I, C. 2, Elsevier, Nueva York, 1993).

Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados de rigurosidad particulares variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación elegido y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos residuales también influyen en la rigurosidad. Se analizan cálculos con respecto a condiciones de hibridación requeridos para conseguir grados particulares de rigurosidad en Sambrook *et al.* (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11. A continuación hay un conjunto ejemplar de condiciones de hibridación:

Rigurosidad muy alta (detecta secuencias que comparten 90 % de identidad)

Hibridación: SSC 5x a 65 °C durante 16 horas

Lavar dos veces: SSC 2x a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos cada uno

Lavar dos veces: SSC 0,5x a 65 °C durante 20 minutos cada uno

Alta rigurosidad (detecta secuencias que comparten 80 % de identidad o más)

Hibridación: SSC 5x-6x a 65 °C-70 °C durante 16-20 horas

Lavar dos veces: SSC 2x a TA durante 5-20 minutos cada uno

Lavar dos veces: SSC 1x a 55 °C-70 °C durante 30 minutos cada uno

Baja rigurosidad (detecta secuencias que comparten más del 50 % de identidad)

Hibridación: SSC 6x a TA hasta 55 °C durante 16-20 horas

Lavar al menos dos veces: SSC 2x-3x a TA hasta 55 °C durante 20-30 minutos cada uno.

Las secuencias de ácido nucleico que no muestran un alto grado de identidad pueden no obstante codificar secuencias de aminoácidos similares, debido a la degeneración del código genético. Se entiende que pueden realizarse cambios en la secuencia de ácido nucleico usando esta degeneración para producir múltiples secuencias de ácido nucleico que codifican cada una sustancialmente la misma proteína.

Sujeto: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye tanto seres humanos como mamíferos no humanos. Este término abarca individuos tanto conocidos como desconocidos, de modo que no hay ningún requisito de que una persona que trabaje con una muestra de un sujeto sepa quién es el sujeto, o incluso de dónde se adquirió la muestra.

Antígeno tumoral o canceroso: un antígeno que puede estimular respuestas inmunitarias de linfocitos T específicas de tumor. Los antígenos tumorales ejemplares incluyen, pero sin limitación, RAGE-1, tirosinasa, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, glucoproteína (gp) 75, gp100, beta-catenina, PRAME, MUM-1, WT-1, CEA y PR-1. Se conocen en la técnica antígenos tumorales adicionales (por ejemplo, véase Novellino *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 54(3): 187-207, 2005) y se describen posteriormente (véase Tabla 2). Antígeno canceroso y antígeno tumoral se usan indistintamente en el presente documento. Los antígenos pueden estar relacionados con cánceres que incluyen, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cánceres relacionados con SIDA; linfoma relacionado con SIDA; cáncer anal; cáncer del apéndice; astrocitoma, cerebeloso o cerebral de la infancia; carcinoma de células basales; cáncer del conducto biliar, extrahepático; cáncer de la vejiga; cáncer de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno; glioma del tronco encefálico; tumor cerebral; tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso; tumor cerebral, astrocitoma cerebral/glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la ruta visual e hipotalámico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; linfoma de Burkitt; tumor carcinoide, de la infancia; tumor carcinoide, gastrointestinal; carcinoma de primario desconocido; linfoma del sistema nervioso central, primario; astrocitoma cerebeloso, de la infancia; astrocitoma cerebral/glioma maligno, de la infancia; cáncer del cuello uterino; cánceres de la infancia; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; linfoma de linfocitos T cutáneo; tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas; cáncer endometrial; ependimoma; cáncer esofágico; sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor de células germinales extracraneales, de la infancia; tumor de células germinales extragonadales; cáncer del conducto biliar extrahepático; cáncer del ojo; melanoma intraocular; cáncer del ojo, retinoblastoma; cáncer de la vesícula biliar; cáncer gástrico (del estómago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal (GIST); tumor de células germinales: extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional; glioma del tronco encefálico; glioma, astrocitoma cerebral de la infancia; glioma, ruta visual de la infancia e hipotalámico; carcinoide gástrico; leucemia por tricoleucitos; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (del hígado); linfoma de Hodgkin; cáncer hipofaríngeo; glioma de la ruta visual e hipotalámico, de la infancia; melanoma intraocular; carcinoma de células de islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); cáncer laríngeo; leucemias; leucemia, linfoblástica aguda (también denominada leucemia linfocítica aguda); leucemia, mieloide aguda (también denominada leucemia mielógena aguda); leucemia, linfocítica crónica (también denominada leucemia linfocítica crónica); leucemia, mielógena crónica (también denominada leucemia mieloide crónica); leucemia, por tricoleucitos; cáncer de la cavidad oral y el labio; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón, no microcítico; cáncer de pulmón, microcítico; linfomas; linfoma, relacionado con el SIDA; linfoma, de Burkitt; linfoma, de linfocitos T cutáneos; linfoma, de Hodgkin; linfomas, no de Hodgkin (una clasificación antigua de todos los linfomas excepto los de Hodgkin); linfoma, del sistema nervioso central primario; Marcus Whittle, enfermedad letal; macroglobulinemia, de Waldenstrom; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma, de la infancia; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); carcinoma de células de Merkel; mesotelioma, maligno adulto; mesotelioma, de la infancia; cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto; cáncer de la boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple, de la infancia; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide; síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide, aguda del adulto; leucemia mieloide, aguda de la infancia; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos, crónicos; cáncer de cavidad nasal y seno paranasal; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer oral; cáncer orofaríngeo; histiocitoma del hueso fibroso maligno/osteosarcoma; cáncer ovárico; cáncer epitelial ovárico (tumor del estroma epitelial de superficie); tumor de células germinales ováricas; tumor ovárico de bajo potencial maligno; cáncer pancreático; cáncer pancreático, células de islotes; cáncer del seno paranasal y la cavidad nasal; cáncer paratiroideo; cáncer del pene; cáncer faríngeo; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, de la infancia; adenoma de la hipófisis; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; linfoma del sistema nervioso central primario; cáncer de próstata; cáncer rectal; carcinoma de células renales (cáncer de riñón); cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, de la infancia; cáncer de glándulas salivales; sarcoma, familia de tumores de Ewing; sarcoma, de Kaposi; sarcoma, de tejido blando; sarcoma, uterino; síndrome de Sezary; cáncer de la piel (no melanoma); cáncer de la piel (melanoma); carcinoma de la piel, células de Merkel; cáncer de pulmón microcítico; cáncer del intestino delgado; sarcoma de tejido blando; carcinoma de células escamosas – véase cáncer de piel (no melanoma); cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer del estómago; tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, de la infancia; linfoma de linfocitos T, cutáneo (micosis fungoide y síndrome de Sézary); cáncer testicular; cáncer de la garganta; timoma, de la infancia; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, de la infancia; cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; tumor trofoblástico, gestacional; carcinoma de sitio primario desconocido, del adulto; cáncer de sitio primario desconocido, de la infancia; cáncer de células transicionales del uréter y la pelvis renal; cáncer uretral; cáncer uterino, endometrial; sarcoma uterino; cáncer vaginal; glioma de la ruta visual e hipotalámico, de la infancia; cáncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms (cáncer de riñón), de la infancia.

En condiciones suficientes para: una frase que se usa para describir cualquier ambiente que permite la actividad deseada.

Vacuna: Una composición inmunogénica que puede administrarse a un mamífero, tal como un ser humano, para conferir inmunidad, tal como inmunidad activa, o una enfermedad u otra afección patológica. Las vacunas pueden usarse de forma profiláctica o terapéutica. Por lo tanto, las vacunas pueden usarse para reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad (tal como un tumor o una infección) o para reducir la gravedad de los síntomas de una enfermedad o afección, limitar la progresión de la enfermedad o afección (tal como un tumor o una infección) o limitar la reaparición de una enfermedad o afección. En realizaciones particulares, una vacuna es un CMV recombinante (tal como un CMVH recombinante o un CMVRh recombinante) que expresa un antígeno heterólogo, tal como un antígeno específico de patógeno o un antígeno tumoral.

Vector: Pueden incorporarse moléculas de ácido nucleico de secuencia particular en un vector que después se introduce en una célula hospedadora, produciendo de este modo una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten replicarlo en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéricos conocidos en la técnica, incluyendo elementos promotores que dirigen la expresión de ácido nucleico. Los vectores pueden ser vectores víricos, tales como vectores de CMV. Los vectores víricos pueden construirse a partir de virus de tipo silvestre o atenuados, incluyendo virus deficientes en replicación. Los vectores también pueden ser vectores no víricos, incluyendo cualquier plásmido conocido en la técnica.

Virus: organismo infeccioso microscópico que se produce dentro de células vivas. Un virus consiste esencialmente en un núcleo de ácido nucleico (el genoma vírico) rodeado de una cubierta proteica (cápside) y tiene la capacidad de replicar solamente dentro de una célula viva. La "replicación vírica" es la producción de partículas víricas adicionales por la aparición de al menos un ciclo vital vírico. Un virus puede alterar las funciones normales de las células hospedadoras, provocando que las células se comporten de una manera determinada por el virus. Por ejemplo, una infección vírica puede dar como resultado que una célula produzca una citocina, o que responda a una citocina, cuando la célula no afectada normalmente no lo hace.

En una infección vírica "lítica" o "aguda", el genoma vírico se replica y se expresa, produciendo los polipéptidos necesarios para la producción de la cápside vírica. Salen de la célula hospedadora partículas víricas maduras, dando como resultado lisis celular. Especies víricas particulares pueden entrar como alternativa en una infección "lisogénica" o "latente". En el establecimiento de latencia, el genoma vírico se replica, pero no se producen proteínas de la cápside ni se ensamblan en partículas víricas.

A no ser que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. De forma similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y" a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. Por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo explicaciones de términos, tendrá preferencia. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Se describen en el presente documento vectores de CMVRh y CMVH recombinantes que codifican antígenos heterólogos, tales como antígenos específicos de patógenos o antígenos tumorales. Los vectores recombinantes desvelados en el presente documento inducen y mantienen respuestas inmunitarias humores y celulares de alto nivel específicas para el antígeno heterólogo. Por lo tanto, los vectores de CMV desvelados son adecuados para su uso como vacunas para tratar o prevenir enfermedad infecciosa y cáncer. También se desvelan vectores de CMVRh y CMVH recombinantes que carecen de al menos un gen esencial o de aumento (virus deficientes en replicación). Los CMV deficientes en replicación pueden incluir un antígeno heterólogo, tal como un antígeno específico de patógeno o un antígeno tumoral, y por lo tanto pueden usarse como vacunas para tratar o prevenir la infección o el cáncer correspondientes. En otros casos, los CMV deficientes en replicación, que están atenuados, carecen de un antígeno heterólogo y pueden usarse como una vacuna contra CMV.

Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento vectores de CMVRh o CMVH recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es un antígeno específico de patógeno. En otras realizaciones, el antígeno heterólogo es un antígeno tumoral.

En algunas realizaciones, el antígeno específico de patógeno es un antígeno vírico. El antígeno vírico puede ser de cualquier virus que se sepa que es patógeno, o contra el que sea deseable inducir una respuesta inmunitaria. En algunos ejemplos, el antígeno vírico es un antígeno de virus de la gripe, virus de la viruela del mono, virus del Nilo Occidental, virus de chikungunya, virus del Ébola, virus de la hepatitis C, poliovirus, virus del dengue de serotipo 1, virus del dengue de serotipo 2, virus del dengue de serotipo 3 o virus del dengue de serotipo 4, Papilomavirus, VIS,

VIH, CMVH, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi, virus de la varicela zóster, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple 1 y virus del herpes simple 2. Se conocen bien en la técnica antígenos específicos de estos y otros virus. Por lo tanto, un experto en la materia puede seleccionar un antígeno adecuado.

En ejemplos particulares, el antígeno del virus de la gripe es hemaglutinina o neuraminidasa, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo; el antígeno del virus de la viruela del mono es A35R, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo; el antígeno del virus del Nilo Occidental es cápside (C), membrana (prM/M), envoltura (E), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B o NS5, o un epítipo de fragmento antigénico del mismo; el antígeno de virus de Chikungunya es cápside (C), glucoproteína de la envoltura 1 (E1), glucoproteína de la envoltura 2 (E2), glucoproteína de la envoltura 3 (E3) o proteína no estructural 1 (NSP1), o un epítipo o fragmento antigénico del mismo; el antígeno del virus del Ébola es nucleoproteína (NP), o un epítipo o fragmento antigénico del mismo; el antígeno del virus de la hepatitis C es núcleo, E1, E2, NS2, NS3, NS4 o NS5, o un epítipo o fragmento antigénico de los mismos; el antígeno de poliovirus es VP1, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo; o el antígeno del virus del dengue es cápside (C), membrana (prM/M), envoltura (E), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B o NS5, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo.

En algunas realizaciones en las que el vector de CMVRh o CMVH recombinante es deficiente en replicación, el vector no incluye un antígeno heterólogo. Dicho vector recombinante, que está atenuado, puede usarse para tratar o prevenir infección con CMV.

En algunas realizaciones, el antígeno específico de patógeno es un antígeno bacteriano. El antígeno bacteriano puede ser de cualquier tipo de bacteria que se sepa que es patógena, o contra la que sea deseable inducir una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el antígeno bacteriano es de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causante de la tuberculosis. En algunas realizaciones, el antígeno bacteriano es de *Clostridium tetani*, el agente causante del tétanos. Se conocen bien en la técnica antígenos específicos de *Clostridium tetani*. Por lo tanto, un experto en la materia puede seleccionar un antígeno adecuado de *Clostridium tetani*. En ejemplos particulares, el antígeno de *Clostridium tetani* es tétanos C.

En algunas realizaciones, el antígeno específico de patógeno es un antígeno fúngico. El antígeno fúngico puede ser de cualquier hongo que se sepa que es patógeno, o contra el que se desee inducir una respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, el antígeno específico de patógeno es un antígeno protozoario. El antígeno protozoario puede ser de cualquier protozoo que se sepa que es patógeno, o contra el que sea deseable inducir una respuesta inmunitaria. En algunos ejemplos, el antígeno protozoario es un antígeno de una especie de *Plasmodium*, tal como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* o *Plasmodium malariae*. Se conocen bien en la técnica antígenos específicos de especies de *Plasmodium*. Por lo tanto, un experto en la materia puede seleccionar un antígeno adecuado. En ejemplos particulares, el antígeno de *Plasmodium* es un antígeno pre-eritrocítico, tal como CSP o SSP2, o un antígeno eritrocítico, tal como AMA1 o MSP1.

En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno expresado por un tumor sólido. En otras realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno expresado por un cáncer hematológico. Se conocen bien en la técnica antígenos tumorales y se proporciona en el presente documento una lista no limitante de antígenos tumorales.

Los vectores de CMVRh o CMVH pueden obtenerse de cualquier aislado, cepa o variante de virus CMVRh o CMVH (tal como un aislado clínico o cepa del laboratorio). En algunas realizaciones, el CMVRh es herpesvirus de Cercopitecino 8. En ejemplos particulares, el CMVRh comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de nucleótidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. El vector de CMVRh también puede ser BAC que codifica genoma de CMVRh. En algunas realizaciones, el vector de CMVRh incluye una supresión de uno o más genes que codifican una proteína inmunomoduladora. En algunos ejemplos, la supresión comprende una supresión de Rh182-189 o Rh158-166, o ambos.

En algunas realizaciones, el CMVH comprende la cepa de laboratorio AD169, la cepa de tipo silvestre Merlin, el aislado de CMVH Towne BAC, aislado de CMVH Toledo-BAC, aislado de CMVH TR-BAC, aislado de CMVH FIX-BAC, aislado de CMVH AD169-BAC o cepa de CMVH Davis. En ejemplos particulares, el vector de CMVH comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En ciertas realizaciones, puede usarse una variante de un vector de CMVH o CMVRh, por ejemplo, una variante que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO 2-9, pero que conserva la capacidad para actuar como un vector.

Están públicamente disponibles y/o se han descrito previamente vectores de CMVRh y CMVH recombinantes. Por ejemplo, están disponibles varios vectores de CMV de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA), incluyendo CMVH AD169 (ATCC VR-538), CMVH Towne (ATCC VR-977) y CMVH Davis (ATCC VR-807). También se ha descrito la cepa de CMVH Toledo (véase Quinnan *et al.*, Ann Intern Med 101: 478-83, 1984). También se describen CMVH y CMVRh recombinantes, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados

Unidos N.º 2009/029755 y Publicación de PCT N.º WO 2006/031 264.

En algunas realizaciones, el vector de CMVRh o CMVH recombinante comprende una supresión en un gen de CMVRh o CMVH que es esencial para o aumenta la replicación. Se han descrito bien en la técnica genes esenciales y de aumento de CMV (véase, por ejemplo, Dunn *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(24): 14223-14228, 2003; y Dong *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(21): 12396-12401, 2003). Los genes de CMV esenciales incluyen, pero sin limitación, UL32, UL34, UL37, UL44, UL46, UL48, UL48.5, UL49, UL50, UL51, UL52, UL53, UL54, UL55, UL56, UL57, UL60, UL61, UL70, UL71, UL73, UL75, UL76, UL77, UL79, UL80, UL82, UL84, UL85, UL86, UL87, UL89, UL90, UL91, UL92, UL93, UL94, UL95, UL96, UL98, UL99, UL100, UL102, UL104, UL105, UL115 y UL122. En algunas realizaciones, el gen esencial o de aumento de CMV es UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44, o un homólogo de los mismos (es decir, el gen homólogo en CMVRh). Se conocen en la técnica y se describen en el presente documento otros genes esenciales o de aumento. En ejemplos particulares, el gen esencial es UL82, o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, los vectores de CMVRh o CMVH recombinantes no incluyen un antígeno heterólogo. En otras realizaciones, el vector de CMVRh o CMVH recombinante que tiene una supresión en un gen esencial o de aumento incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, tal como un antígeno específico de patógeno o un antígeno tumoral. También se proporcionan composiciones que comprenden vectores de CMVRh o CMVH recombinantes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vectores y composiciones pueden usarse, por ejemplo, en un método de tratamiento de un sujeto con una enfermedad infecciosa, o en riesgo de infectarse con una enfermedad infecciosa, o con cáncer, o en riesgo de desarrollar cáncer. Los vectores de CMV que tienen una supresión de al menos un gen esencial o de aumento están en general atenuados y por lo tanto pueden usarse como vacunas para el tratamiento o la prevención de CMV (en cuyo caso, el vector recombinante no codifica un antígeno heterólogo).

En algunas realizaciones, los vectores de CMVRh o CMVH recombinantes comprenden un medio de suicidio o seguridad para evitar la replicación adicional del virus. Por ejemplo, los vectores de CMV recombinantes pueden incluir sitios *LoxP* que flanquean un gen o una región esencial del genoma de CMVRh o CMVH (se han enumerado anteriormente y se conocen en la técnica genes de CMV esenciales), así como la secuencia codificante de Cre-recombinasa. Cre-recombinasa está generalmente bajo el control de un promotor inducible para regular la expresión de Cre, controlando de este modo la retirada del gen esencial y la inhibición de la replicación vírica. En ejemplos particulares, Cre es una Cre regulada por Tet y la expresión de Cre está controlada por la presencia de Dox.

También se proporcionan composiciones que comprenden un vector de CMVRh o CMVH recombinante desvelado en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona además un método para tratar a un sujeto con una enfermedad infecciosa, o en riesgo de infectarse con una enfermedad infecciosa, o con cáncer, o en riesgo de desarrollar cáncer, seleccionando un sujeto que necesite tratamiento y administrando al sujeto un vector de CMVRh o CMVH recombinante, o composición del mismo, desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, la selección de un sujeto que necesite tratamiento incluye seleccionar un sujeto al que se ha diagnosticado una enfermedad infecciosa, tal como una enfermedad vírica, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica o una enfermedad protozoaria. En otras realizaciones, la selección de un sujeto que necesite tratamiento incluye seleccionar un sujeto que se ha expuesto o probablemente se exponga a un agente infeccioso. En otras realizaciones, la selección de un sujeto que necesite tratamiento incluye seleccionar un sujeto al que se ha diagnosticado cáncer. En otras realizaciones, la selección de un sujeto que necesite tratamiento incluye seleccionar un sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer, tal como un sujeto que se ha expuesto a un carcinógeno, un sujeto que tiene cáncer asociado con mutaciones genéticas o un sujeto que ha tenido previamente cáncer.

En algunas realizaciones de los métodos, la enfermedad infecciosa es infección por virus de la gripe y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus de la gripe. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es infección por virus de la viruela del mono y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de virus de la viruela del mono. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es infección por virus del Nilo Occidental y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus del Nilo Occidental. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es infección por virus de chikungunya y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus de chikungunya. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es infección por virus del Ébola y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus del Ébola. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es infección por virus de la hepatitis C y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus de la hepatitis C. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es infección por poliovirus y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de poliovirus. En otras realizaciones, la enfermedad infecciosa es dengue y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus del dengue de serotipo 1, virus del dengue de serotipo 2, virus del dengue de serotipo 3 o virus del dengue de serotipo 4. En otras realizaciones, la enfermedad es síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o una infección por virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de VIH o VIS. En otras realizaciones, la enfermedad es o está relacionada con verrugas cutáneas, verrugas genitales, cáncer del cuello uterino o papilomatosis respiratoria, y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de VPH. En otras realizaciones, la enfermedad es Malaria y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de protistas eucariotas del género *Plasmodium*. En otras

realizaciones, la enfermedad es fiebre hemorrágica del Ébola y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus del Ébola. En otras realizaciones, la enfermedad es tuberculosis y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. En otras realizaciones, la enfermedad es fiebre hemorrágica del Ébola y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno del virus del Ébola.

En otras realizaciones, la enfermedad es una enfermedad de Herpes y el vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de un virus del Herpes. Una enfermedad de herpes incluye pero sin limitación Herpes Genital, Varicela o Herpes Zóster (culebrilla), mononucleosis infecciosa y sarcoma de Kaposi. El vector de CMVRh o CMVH recombinante codifica un antígeno de virus que incluyen pero sin limitación virus del Herpes simple 1 (VHS-1), virus del Herpes simple 2 (VHS-2), virus de la varicela zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), Roseolovirus y herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (HVS-K). En algunas realizaciones de los métodos, la enfermedad infecciosa es infección por CMV y el vector no incluye un antígeno heterólogo.

En algunas realizaciones de los métodos, el cáncer es un tumor sólido y el vector de CMVRh o CMVH codifica un antígeno tumoral de un tumor sólido. En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico y el vector de CMVRh o CMVH codifica un antígeno tumoral de un cáncer hematológico.

Los citomegalovirus (CMV) comprenden un subgrupo definido, ampliamente distribuido, de β -herpesvirus que comparten características de crecimiento comunes, citopatología característica, tropismo de glándulas salivales y una capacidad para establecer infección persistente y latente. Estando entre los mayores y más complejos de los virus conocidos, los viriones de CMV varían en su tamaño de 150-200 nm e incluyen un genoma de ADN bicatenario de 230 kb capaz de codificar más de 200 proteínas. Se cree que los β -herpesvirus en general y los CMV en concreto, han surgido antes de la radiación de los mamíferos y, por lo tanto, la evolución vírica ha acompañado a la especiación de los mamíferos de modo que cada especie tiene su propio CMV adaptado de forma única, y la relación entre los CMV generalmente es paralela a la relación entre las especies. Por lo tanto, la genética y biología de CMV de primates (ser humano, chimpancé, MR) están relacionadas de forma considerablemente más estrecha entre sí que con CMV de roedores. Tanto en seres humanos en países en desarrollo como en MR, la infección por CMV es esencialmente universal mostrando el 90-100 % de los adultos pruebas serológicas de infección (Vogel *et al.*, Lab Anim Sci 44(1): 25-30, 1994; Ho, Rev Infect Dis 12 Supl 7: S701-710, 1990). En áreas acomodadas de países desarrollados, el aumento de la higiene ha limitado en cierta medida la transmisión mostrando solamente el 40-60 % de la población adulta serorreactividad. Para la amplia mayoría de sujetos expuestos (inmunológicamente normales), humanos o monos, la infección aguda con CMV es completamente asintomática (Zanghellini *et al.*, J Infect Dis 180(3): 702-707, 1999; Lockridge *et al.*, J Virol 73(11): 9576-83, 1999); una pequeña fracción de seres humanos (<5 %) experimentan enfermedad sintomática, pero benigna, y una fracción aún más pequeña experimenta un síndrome de mononucleosis (CMV representa aproximadamente el 8 % de todos los casos de mononucleosis) (Zanghellini *et al.*, J Infect Dis 180(3): 702-707, 1999).

Después de la infección inicial, CMV se disemina durante meses a años en múltiples fluidos corporales (saliva, lágrimas, orina, secreciones genitales, leche materna) y la transmisión implica en general la exposición de la mucosa a dichos fluidos, y se produce de forma poco sorprendente en situaciones en las que dicha "transferencia" de secreción es común (infancia temprana y adolescencia). El CMV persiste en el hospedador indefinidamente y la diseminación vírica puede producirse años después de la exposición. El CMV puede manifestar infección latente de sus células diana, y como otros herpesvirus, esta capacidad probablemente desempeña un papel en su notable persistencia. Sin embargo, a diferencia del herpes simple y el virus de la varicela zóster, la frecuencia de diseminación (particularmente en monos), la cinética de reactivación después de trasplante y la fuerza única de la respuesta de linfocitos T sugieren que los focos de replicación de CMV activa aparecen con frecuencia, si no continuamente, en alguna parte del cuerpo del hospedador infectado. Dicha persistencia activa implica un medio para evitar la inmunidad del hospedador y, de hecho, el CMV ha desarrollado diversos mecanismos para manipular respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, incluyendo genes que modulan/interfieren con 1) presentación de Ag y otra función de la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), 2) migración de leucocitos, activación y respuestas de citocinas, 3) función de receptores de Fc y 4) susceptibilidad de las células hospedadoras a la inducción de la apoptosis (Mocarski, Trends Microbiol 10(7): 332-329, 2002; Atalay *et al.*, J Virol 76(17):8596-608, 2002; Skaletskaya *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98(14): 7829-34, 2001; Penfold *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 96(17): 9839-9844, 1999; Benedict *et al.*, J Immunol 162(12): 6967-6970, 1999; Spencer *et al.*, J Virol 76(3): 1285-92, 2002). Estas estrategias de evasión inmunitaria sofisticadas podrían explicar la capacidad del CMV para reinfectar hospedadores inmunitarios (Plotkin *et al.*, J Infect Dis 159(5):860-865, 1989; Boppana *et al.*, N Engl J Med 344(18):1366-1371, 2001; y véase posteriormente).

A pesar de esta notable persistencia y evasión inmunitaria, y a pesar de la capacidad del CMV para replicar en una amplia diversidad de tipos celulares, la enfermedad manifiesta en infección por CMV crónica es extremadamente poco habitual. De hecho, dada su naturaleza esencialmente apatógena en niños normales y adultos, el CMV probablemente sería un virus desconocido, si no fuera por el descubrimiento en los años 50 de su implicación en la enfermedad de inclusión citomegálica fetal/neonatal, un problema médico importante debido a su daño asociado al SNC y órganos sensoriales, y posteriormente, su aparición como uno de los patógenos oportunistas más comunes y devastadores en los escenarios de trasplante de médula ósea/órganos y SIDA. Estas situaciones tienen una característica común sorprendente, la inmunodeficiencia, particularmente en inmunidad mediada por células,

relacionada con inmadurez inmunológica, inmunosupresión farmacológica (trasplante) o la inmunodeficiencia progresiva de infección por VIH. Esta relación bien caracterizada entre inmunidad y enfermedad de CMV sugiere que la infección por CMV ejemplifica una relación de hospedador-parásito compleja en la que se ha “negociado” evolutivamente un equilibrio delicado entre los mecanismos víricos de la patogenia, la persistencia y la evasión inmunitaria y la respuesta inmunitaria del hospedador. En esencia, el virus no se elimina del hospedador y tiene libertad relativa para replicar en sitios de excreción; sin embargo, la inmunidad del hospedador restringe la replicación en la mayoría de sitios, en los que dicha replicación conduciría a enfermedad. Con este equilibrio, el virus está generalizado en una población de hospedadores grande lo que no podría suceder con patogenia incontrolada. Con respecto al hospedador, la capacidad de un sistema inmunitario normal para esencialmente eliminar la patogenia dentro de miembros reproductivamente relevantes de la población sugiere que el soporte de este patógeno no presenta una desventaja evolutiva significativa.

Aunque los requisitos inmunológicos para mantener este equilibrio hospedador-virus aún no están bien caracterizados, se sabe que los “recursos” inmunológicos específicamente dedicados al CMV son bastante grandes. La mediana de las frecuencias de respuesta de linfocitos T CD4+ a CMV humano (CMVH) son 5-10 veces mayores que la mediana de las frecuencias de respuestas de linfocitos T CD4+ a virus no persistentes (completos) tales como virus de las paperas, el sarampión, la gripe y adenovirus, e incluso otros virus persistentes tales como virus del herpes simple y de la varicela zóster. También son típicas respuestas de linfocitos T CD8+ de alta frecuencia a epítomos u ORF de CMVH particulares. Los solicitantes han cuantificado respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre total al genoma de CMV completo (usando ~14.000 péptidos solapantes, citometría de flujo de citocinas y una gran cohorte de sujetos CMV seropositivos con HLA dispares). Los solicitantes han “consultado” todos estos péptidos (mezclas de 217 ORF) en 24 sujetos CMV seropositivos y 5 seronegativos y han descubierto que, cuando se suman, la mediana de las frecuencias de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de CMV en sujetos CMV seropositivos son 5-6 % de las poblaciones de linfocitos T CD4+ o CD8+ totales (que corresponden a 10-11 % de las poblaciones de memoria) (FIGs. 1, 2). Las respuestas totales en sujetos seronegativos son menores de 0,5 %, un número que representa el “fondo” de este análisis de suma. Sorprendentemente, en algunos individuos, los linfocitos T específicos de CMV representan más del 25 % del repertorio de linfocitos T de memoria en sangre periférica. Esta respuesta de linfocitos T es amplia, cada sujeto reconoce un promedio de 19 ORF de CMVH (distribuidos aproximadamente igual entre respuestas CD4 y CD8) y al menos 28 ORF provocan respuestas de linfocitos T CD4+ o CD8+ significativas ($\geq 0,2$ % de la población de memoria de sangre periférica) en 20 % o más de los sujetos ensayados.

Los mecanismos precisos por los que esas poblaciones de linfocitos T específicas de CMV grandes se generan y mantienen después de la infección no se entienden, pero probablemente estén relacionadas con la capacidad de este virus para mantener infección, incluyendo infección activa, productiva, en microambientes locales, frente a una respuesta inmunitaria sustancial durante la vida del hospedador. Además, el CMV es capaz de reinfectar hospedadores completamente inmunes (Boppana *et al.*, N Engl J Med 344(18): 1366-1371, 2001; Plotkin *et al.*, J Infect Dis 159(5): 860-865, 1989), y se ha mostrado en el presente documento en el modelo de MR que la reinfección experimental aumenta significativamente las frecuencias de estado estacionario de linfocitos T específicos de CMV, lo que indica que la reinfección periódica desempeña un papel central en la acumulación extraordinaria de frecuencias de respuestas de linfocitos T específicas de CMV. Finalmente, las capacidades de CMVH para infectar células presentadoras de Ag profesionales (macrófagos, células dendríticas) y producir cuerpos densos abundantes (complejos de proteína de tegumento con envoltura que pueden “infectar” células diana pero carecen de material genético) podrían contribuir a la generación de estas respuestas de linfocitos T robustas.

Es importante que las características de la respuesta de anticuerpo antivírico a CMVH reflejen las mencionadas anteriormente para inmunidad de linfocitos T antivírica. Las respuestas de anticuerpos específicas de CMVH son notables por su reactividad con un gran número de proteínas víricas y por la persistencia de títulos estables contra proteínas víricas durante décadas. Los anticuerpos específicos para proteínas codificadas por CMVH, incluyendo las proteínas estructurales preparadas solamente durante la replicación vírica, se desarrollan rápidamente después de infección primaria y se mantienen a títulos significativos, probablemente debido a la expresión persistente de proteínas codificadas por el virus. También está presente anticuerpo específico para CMVH en superficies mucosas, quizás como resultado del tropismo de este virus para glándulas secretoras. Resulta interesante que las respuestas de anticuerpos anti-CMVH también se refuerzan después de reinfecciones adquiridas en la comunidad y reinfecciones en receptores de trasplantes.

Como se ha indicado anteriormente, los MR, el modelo animal más utilizado de infección por lentivirus (VIS), presentan una infección por CMV natural que se asemeja estrechamente a la infección humana con CMVH con respecto a epidemiología, patrones de infección y enfermedad en hospedadores inmunocompetentes e inmunodeficientes, particularmente incluyendo el papel del CMVRh como un patógeno oportunista importante de monos infectados por VIS. No resulta sorprendente que esta reacción biológica se ve reflejada por la relación genética. El trabajo temprano ha revelado alta homología entre los genes de CMVH gB, IE1 y UL121-117 y sus homólogos de CMVRh (Kravitz *et al.*, J Gen Virol 78(Pt 8): 2009-2013, 1997; Barry *et al.*, Virology 215(1): 61-72, 1996). Los solicitantes obtuvieron y analizaron la secuencia completa de la cepa de CMVRh 68.1, e identificaron 236 ORF potenciales de 100 o más aminoácidos que se disponen posicionalmente de manera similar a sus homólogos de CMVH. De estos 236 ORF, 138 (58,47 %) son claramente homólogos de proteínas de CMVH conocidas. Algunos

de los CMVRh que son homólogos de ORF de CMVH que se sabe que no son esenciales para la replicación en fibroblastos se enumeran en la Tabla 1 a continuación. En algunas realizaciones, estos ORF son sitios para inserción de antígenos patógenos para la expresión en los vectores de vacuna basados en CMV desvelados.

- 5 En comparación, el CMV murino codifica 170 ORF, de los que 78 (45,9 %) son homólogos de proteínas de CMVH conocidas. Resulta importante que a diferencia de CMV murino, CMVRh codifica un complemento completo de genes de evasión inmunitaria de tipo CMVH, y proteínas del tegumento con suficiente homología con CMVH para formar cuerpos densos.

10 Tabla 1. Ejemplos representativos de ORF de CMVRh con homólogos en el genoma de CMVH

ORF de CMVRh	ORF de CMVH	Mutante de CMVRh
Rh01	RL1	
Rh05	UL153	
Rh17	UL4	
Rh19	UL7	
Rh20	UL6	
Rh31	UL13	
Rh33	UL14	25698, 25739
Rh35a	UL19	
Rh36	UL20	
Rh40	UL23	31242
Rh42	UL24	31782, 32619
Rh43	UL25	33323, 33711
Rh54	UL31	
Rh56	UL33	
Rh59	UL35	
Rh68	UL42	
Rh69	UL43	54274
Rh72	UL45	57859, 58210
Rh107	UL78	
Rh123	UL88	122332, 122472
Rh143	UL111A	
Rh148	UL116	
Rh151/2	UL118/9	
Rh155	UL121	155860
Rh158	UL147	
Rh159	UL148	165110
Rh160	UL132	
Rh160a	UL130	
Rh162	UL145	
Rh163	UL144	
Rh164	UL141	
Rh181	US1	
Rh182	US2	
Rh184	US3	
Rh189	US11	
Rh190	US12	
Rh192	US13	
Rh198	US17	
Rh199	US18	
Rh200	US19	
Rh201	US20	
Rh202	US21	
Rh203	US22	
Rh221	US29	
Rh223	US30	
Rh225	US31	

Cada ORF de CMVRh anotado, así como varios ORF no reconocidos previamente (Rh35a y Rh160a), se comparó con el conjunto completo de ORF de CMVH usando el algoritmo BlastP. Las puntuaciones con una significación de $\leq 10^{-5}$ se consideraron aciertos. Si más de un ORF de CMVRh correspondía a un ORF de CMVH (por ejemplo, Rh111 y 112 son homólogos de UL83) la ORF de CMVRh se excluyó de la lista. Nueve de las ORF de CMVRh se

han mutado por inserción de un transposón, y se indican sitios de inserción. Las ORF de Rh151/2 corresponden a las ORF de CMVH UL118/9 con corte y empalme.

Básicamente, se usó BlastP para buscar en el genoma de CMVRh ORF que sean homólogos de ORF de CMVH que se sabe que no son esenciales para replicación en fibroblastos. Estas ORF de CMVH no esenciales se identificaron: (i) a partir de la bibliografía; (ii) de mutagénesis de transposones de la cepa AD169 de CMVH; y (iii) del hecho de que están en aislados clínicos pero no la cepa de laboratorio AD169. Un total de 48 ORF de CMVRh cumplieron estos criterios y se enumeran en la Tabla 1. Se sabe que los homólogos de CMVH de estas tres ORF (Rh182, 184 y 189) son genes inmunomoduladores, y tres ORF inmunomoduladoras adicionales (Rh185, Rh186 y Rh187) no se identificaron en el análisis de BlastP debido a que sus homólogos de CMVH se suprimieron durante la clonación de BAC de los CMVH clínicos que se secuenciaron. Para confirmar la relación entre las ORF de CMVRh y CMVH, se usó ClustalW para realizar múltiples alineamientos de secuencias. Cada ORF de CMVRh se comparó con las ORF correspondientes de cuatro aislados clínicos de CMVH. Este análisis demostró que cada ORF de CMVRh tiene un ortólogo en los cuatro aislados clínicos de CMVH que se han secuenciado, y confirmó que las ORF de los virus de rhesus y seres humanos están de hecho relacionadas, descartando la posibilidad de que las puntuaciones de BlastP originales resultaran de homologías cortas en proteínas por lo demás no relacionadas.

En vectores ejemplares particulares, se suprimen dos bloques génicos: Rh182-189, que contiene homólogos de los genes inmunomoduladores de CMVH conocidos US2-11, y Rh158-166, que contiene genes que están presentes en aislados clínicos pero ausentes en cepas de laboratorio de CMVH.

La homología entre infecciones por CMVH y CMVRh se extiende también a sus respuestas inmunitarias respectivas. Como se muestra posteriormente y en las FIGs. 3 y 4, la respuesta de linfocitos T de MR a CMVRh en sangre periférica es similar a la del ser humano tanto en tamaño como en las ORF de CMV diana. Además, la accesibilidad aumentada del modelo de MR ha permitido investigación sobre las frecuencias de estos linfocitos T específicos de CMVRh en sitios tisulares, y la respuesta inmunológica a reinfección por CMVRh. Con respecto a lo primero, como se ilustra en la FIG. 5, la representación de linfocitos T específicos de CMV en el repertorio de memoria en la interfaz de tejido pulmonar: aire puede ser verdaderamente enorme, con frecuencia más de 10 veces mayor que en la sangre periférica. Con respecto a lo segundo, la inoculación de MR inmunes a CMV con CMVRh de tipo silvestre vivo (pero no inactivado) da como resultado un refuerzo drástico de respuestas de linfocitos T (tanto CD4+ como CD8+) y anticuerpos específicos de CMV (FIG. 6). Los títulos de anticuerpos reforzados parecen volver a la línea basal después de aproximadamente 2 meses, pero resulta importante que las frecuencias en sangre periférica de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de CMV parecen estabilizarse a niveles 50-100 % mayores que su línea basal previa, lo que sugiere que reinfecciones periódicas o reactivaciones manifiestas contribuyen sustancialmente a la alta frecuencia de linfocitos T específicos de CMVRh observados en la mayoría de MR adultos.

Muchas de las características reconocidas de CMV hacen a este virus altamente atractivo como un vector de vacuna, tal como un vector de vacuna para un agente infeccioso o cáncer. En primer lugar, la capacidad de los CMV para inducir respuestas de anticuerpos fuertes y respuestas de linfocitos T robustas se centró en sitios de mucosa (FIGs. 3-5) que es relevante para la defensa del hospedador (particularmente para VIS/VIH). Los solicitantes creen que estas fuertes respuestas reflejan una situación de estado estacionario, mantenido de forma indefinida, en lugar de las respuestas pico después del refuerzo que con frecuencia se destacan en estudios de vacunas de la técnica anterior.

En segundo lugar, el CMV tiene la capacidad de reinfectar hospedadores inmunitarios y generar nuevas respuestas inmunitarias con dichas reinfecciones. Para confirmar este fenómeno directamente con CMVRh, se construyó un vector de CMVRh particular que codifica gag de VIS (FIG. 7). Este vector mostró expresión de gag inequívoca tanto por inmunotransferencia como por transferencia de Western (FIG. 8), y demostró cinética de crecimiento *in vitro* indistinguible de la del virus de tipo silvestre. Cuando se administraron por vía subcutánea (5×10^6 UFP) a 4 MR CMVRh seropositivos (224 días después de la infección primaria), se observó un refuerzo similar (clínicamente asintomático) de la respuesta de linfocitos T y anticuerpos específicos de CMVRh como se describe en la FIG. 6. Como se ha observado previamente en la reinfección (FIG. 6), la PCR en tiempo real no identificó CMVRh, de tipo silvestre o gag recombinante, en células mononucleares de sangre o lavado pulmonar en ningún punto temporal después de la inoculación vírica. Sin embargo, la orina del día 127 después de la reinfección fue débilmente positiva para expresión de gag por ELISA, lo que sugiere la presencia de vector de CMVRh-gag. Estas muestras se cocultivaron para aislar CMVRh, y estas preparaciones víricas obtenidas *in vivo* se evaluaron con respecto a expresión de gag por transferencia de Western. Como se muestra en la FIG. 8, los cocultivos de CMVRh de los 4 animales expresaron gag inmunorreactivo, estableciendo de forma definitiva la presencia del virus recombinante administrado en sitios secretores. El análisis retrospectivo de orina en puntos temporales después de la reinfección más tempranos reveló la presencia de vector de CMVRh que expresa gag el día 7 en un MR y el día 21 en los otros 3. Además, el vector de CMVRh que expresa gag también se ha detectado en saliva, y permanece presente en orina al menos hasta el día 237 después de la reinfección.

Estos datos tienen dos implicaciones críticas. En primer lugar, demuestran inequívocamente que CMV es capaz de reinfectar sujetos inmunitarios, compitiendo eficazmente con virus de tipo silvestre preexistente, y dirigiéndose de algún modo a su nicho "ecológico" habitual a pesar de inmunidad celular y humoral fuertemente reforzada dirigida al

CMV. En segundo lugar, demuestran la estabilidad *in vivo* de vectores de CMVRh que expresan neoAg exógenos, lo que indica que estos vectores son capaces de infectar de forma persistente sujetos inoculados y mantener de forma indefinida la expresión de los genes codificantes de antígenos exógenos, insertados.

- 5 Esta cohorte reinfectada con CMVRh-gag también se usó para evaluar la capacidad de vectores de CMVRh para iniciar una respuesta inmunitaria *de novo* frente al refuerzo de memoria específico de CMV masivo asociado con la reinfección.

10 Como se muestra en las FIGs. 9 y 10, todos los MR inoculados desarrollaron respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicas de gag en la sangre, tan pronto como el día 7 después de la reinfección. Estas respuestas sanguíneas alcanzaron un máximo el primer mes después de la reinfección a 0,2 %-0,6 % de células de memoria, reduciéndose posteriormente hasta un nivel estable en el intervalo de 0,1 %-0,2 %. También se indujeron anticuerpos específicos de gag de VIS el día 14 después de la infección, aumentando hasta el día 91 después de la infección, antes de conseguir un nivel estable (FIG. 12). La readministración del mismo vector de CMVRh-gag (el día 238 después de la reinfección) reforzó drásticamente ambos examinados, estas respuestas permanecieron mayores que los "puntos establecidos" previos, lo que sugiere el establecimiento de mayores niveles estables. Significativamente, como se ha mostrado previamente para respuestas de linfocitos T específicos de CMVRh, las frecuencias sanguíneas de estas respuestas de linfocitos T específicas de gag con vector de CMV sustancialmente infraestimaron (>10X) la frecuencia de linfocitos T específicos de VIS en un sitio efector tisular, el pulmón (FIGs. 10 y 11). Se descubrieron linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de gag en líquido de lavado pulmonar el día 7 después de la reinfección por CMVRh (gag) inicial en todos los MR, alcanzando un máximo con frecuencias de hasta 10 % (día 42-56 después de la reinfección) antes de conseguir niveles estables en el intervalo de 1 %-3 %. El refuerzo (la segunda reinfección) dio como resultado un fuerte aumento en estas frecuencias con vuelta al nivel estable previo en 2 MR, y lo que parece ser (el día 70 después de la reinfección n.º 2) niveles estables ligeramente mayores en los otros 2 animales. Significativamente, la frecuencia y distribución de linfocitos T específicos de gag en estos MR inmunizados con CMVRh (gag) son comparables a lo que se ha observado en MR "inmunizados" con VISmac239(Δnef) atenuado que controló eficazmente la exposición I.V. con VISmac239 de tipo silvestre (FIG. 13). Debería observarse también que en todos los MR estudiados, las respuestas específicas de gag observadas se produjeron en el escenario de refuerzo significativo de respuestas específicas de CMVRh (FIG. 9); de hecho, es posible que estas respuestas específicas de CMV de recuerdo actuaran como un adyuvante para la nueva respuesta específica de gag. Significativamente, estos datos demuestran la capacidad de CMVRh para actuar eficazmente como un vector para neoAg en MR inmunes a CMVRh.

35 De acuerdo con aspectos particulares de la presente divulgación, la capacidad única de CMV para actuar eficazmente como vector de respuestas de neoAg en sujetos inmunes a CMV tiene varias implicaciones altamente significativas para su utilidad en una vacuna. En primer lugar, en virtud del hecho de que cualquier sujeto CMV+ sano ha demostrado operativamente su capacidad para controlar la infección por CMV de tipo silvestre, se esperaría que su riesgo de morbilidad después de la administración de vectores de CMV, incluso vectores basados en un genoma de CMV por lo demás no modificado, fuera mínimo. Aunque los fetos de madres CMV+ pueden infectarse en algunas circunstancias, este riesgo puede evitarse simplemente no proporcionando vacunas basadas en CMV a mujeres embarazadas. Se esperaría que la incorporación de mecanismos de seguridad (por ejemplo, suicidio inducible) y/o supresión génica estratégica (para reducir el potencial patógeno sin sacrificar la inmunogenia y persistencia) redujera la posibilidad de morbilidad por la vacuna aún más. También debería observarse que otros herpesvirus bien estudiados que podrían usarse potencialmente como vectores persistentes y quizás con capacidad de reinfección tienen uno o más elementos que mitigan contra dicho uso. Por ejemplo, los γ -herpesvirus virus de Epstein Barr (VEB) y Herpesvirus de Sarcoma de Kaposi (HVS/K) están asociados firmemente con tumores malignos, mientras que el CMV no. Adicionalmente, los α herpesvirus (herpes simple) carecen de la inmunogenia de linfocitos T generalizada de CMV y debido a la neurovirulencia (por ejemplo, encefalitis herpética) parecería que tienen un considerable potencial más patógeno en individuos por lo demás inmunocompetentes.

50 La segunda implicación de la capacidad de reinfección de CMV y la demostración en el presente documento de que una inoculación posterior con el mismo vector de CMVRh induce un fuerte refuerzo inmunológico al producto génico recombinante (VIS) (FIG. 11), es que, a diferencia de esencialmente todos los otros vectores víricos actualmente en uso o en desarrollo, los vectores de CMV pueden usarse probablemente de forma repetida. De hecho, de acuerdo con realizaciones particulares de la presente divulgación, los individuos se vacunan en serie con diferentes vectores de CMV para generar respuestas a nuevos epítomos.

60 En una realización del presente documento, se desvela que una respuesta inmunitaria anti-VIH/VIS, conducida por CMV (por ejemplo, activa en el momento de exposición a VIH/SIV) es suficiente para contener la replicación vírica, trancar la diáspora vírica inicial, evitar la inmunopatogenia y establecer una infección no progresiva. Aspectos de la presente divulgación incorporan clones de evolución del CMV y proporcionan CMV modificado técnicamente de forma estratégica y optimizado como un vector de vacuna que codifica ORF heterólogo. La combinación de CMV de 1) inmunogenia notable, 2) baja patogenia, 3) persistencia, 4) diseminación tisular generalizada y 5) la capacidad de reinfectar hospedadores CMV+ es sustancial y fundamentalmente diferente de otros vectores de vacunas en desarrollo. De hecho, el hecho de la persistencia, por sí solo, hace a este enfoque sustancialmente provechoso. De acuerdo con aspectos particulares, la exposición a antígeno a largo plazo, como es posible con los vectores de

vacuna basados en CMV desvelados, se correlaciona con una respuesta inmunitaria anti-lentivírica cualitativamente diferente y funcionalmente superior.

Para consideraciones de seguridad, los vectores de CMV, con todo su potencial único, deben manipularse apropiadamente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los vectores de vacunación basados en CMV se usan para inducir inmunidad de neoAg en hospedadores CMV+, que tienen, por su estado CMV+, sano, establecida su capacidad para contener este virus. Aunque ningún vector de virus vivo está exento de riesgo, en el escenario apropiado (tal como en el contexto de preadolescentes CMV+, que puede demostrarse que son inmunocompetentes), el riesgo de patogenia por vector de CMV grave, incluso con vectores no modificados para seguridad, debería ser mínimo. De acuerdo con aspectos adicionales de la presente divulgación, incluso el potencial relativamente bajo de inducción de enfermedad de CMV de tipo silvestre es anulable por manipulación genética del vector de CMV sin sacrificar la inmunogenia o persistencia.

De acuerdo con aspectos de la presente divulgación, los vectores de CMV, solos o en combinación con otras modalidades, proporcionan respuestas inmunitarias celulares y humorales cualitativamente superiores contra enfermedad infecciosa, de modo que dichos problemas se contengan de forma significativa. Los aspectos adicionales proporcionan vectores seguros sin sacrificar las capacidades de persistencia y de reinfección únicas. De acuerdo con otros aspectos más, diversos genes de CMV son suprimibles sin sacrificar la función del vector y vectores ejemplares particulares usan el "espacio" genómico creado por dichas supresiones para inserción de construcciones de seguridad (por ejemplo, mecanismos de suicidio inducible) así como mayores casetes codificantes de genes (poli-cistronicos). Este enfoque de supresión génica se diseña para conservar el equilibrio entre inmunogenia/persistencia y patogenia, y aprovecha la redundancia de adaptaciones del CMV para proporcionar vectores optimizados para CMVRh modificados técnicamente.

En algunas realizaciones, los vectores de CMVRh se diseñan para reflejar genes y biología que son homólogos de CMVH y los diseños de CMVRh optimizados son directamente aplicables a la construcción de realizaciones de vectores de CMVH.

En algunas realizaciones, los vectores de CMV desvelados en el presente documento codifican un antígeno heterólogo. El antígeno heterólogo es un polipéptido antigénico codificado por un polinucleótido heterólogo que se incorpora en el vector de CMV recombinante. En ejemplos particulares, el polipéptido antigénico se obtiene de una bacteria, un hongo, un protozoo, un virus o un tumor. El polipéptido puede ser cualquiera que se use de forma beneficiosa como un antígeno para estimular una respuesta inmunitaria, aunque se contempla que el beneficio de provocar una respuesta inmunitaria a largo plazo contra un antígeno particular influirá en su selección.

La secuencia polipeptídica antigénica puede ser de cualquier longitud suficiente para inducir la respuesta inmunitaria. En ejemplos particulares, el polipéptido es de al menos 8, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 aminoácidos de longitud o mayor. De forma similar, no es necesario que la identidad de secuencia del polipéptido antigénico sea idéntica a la identidad de secuencia con el polipéptido nativo para que sea suficiente para mantener la especificidad de la respuesta inmunitaria contra la bacteria, el protozoo, el hongo, el virus o el tumor. Un experto en la materia reconocerá que la secuencia de un polipéptido puede alterarse de forma significativa manteniendo al mismo tiempo su especificidad antigénica, es decir, la capacidad para estimular una respuesta antigénica que aún proporcionará sensibilidad a la proteína nativa. Por lo tanto, en ejemplos particulares, el polipéptido antigénico es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntico al polipéptido del que se obtuvo. En ejemplos particulares, el polipéptido es un análogo del polipéptido hospedador que se encuentra en una especie diferente (xenogénico).

Un experto habitual reconocerá que las listas de polipéptidos heterólogos ejemplares analizadas en el presente documento no son exhaustivas ni se pretende que sean limitantes. Por lo tanto, se reconocerá que los métodos proporcionados en el presente documento son útiles para expresión de, y por lo tanto estimulación inmunitaria relacionada con, cualquier polipéptido contra el que sea beneficioso generar inmunidad.

En algunas realizaciones, el antígeno heterólogo es un polipéptido derivado de un organismo patógeno tal como bacterias, hongos, protozoos o virus.

Los ejemplos de virus patógenos incluyen, pero sin limitación, los de las siguientes familias de virus: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de leucemia de linfocitos T humana; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C, enterovirus, virus de coxsackie humanos, rinovirus, echovirus, virus de la fiebre aftosa); *Caliciviridae* (tales como cepas que provocan gastroenteritis, incluyendo virus de Norwalk); *Togaviridae* (por ejemplo, alfavirus (incluyendo virus de chikungunya, virus de la encefalitis equina, virus del bosque de Semliki, virus de Sindbis, virus del Río Ross, virus de la rubeola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis japonesa, virus de Powassan y otros virus de encefalitis); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus, virus del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola, virus de Marburg); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio);

Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus Sin Nombre, virus de la fiebre del Valle del Rift, bunyavirus, flebovirus y nairovirus); *Arenaviridae* (tales como virus de la fiebre de Lassa y otros virus de fiebre hemorrágica, virus de Machupo, virus de Junín); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus, rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del poliovirus, virus de BK); *Adenoviridae* (adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS)-1 y VHS-2; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr; virus de la varicela zóster; y otros virus del herpes, incluyendo VHS-6); *Poxviridae* (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (tal como virus de la fiebre porcina africana); *Astroviridae*; y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B).

Los ejemplos de patógenos bacterianos incluyen, pero sin limitación: *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (tales como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* de Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Bordetella pertussis*, *Shigella flexnerii*, *Shigella dysenteriae* y *Actinomyces israelii*.

Los ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, pero sin limitación, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Otros patógenos (tales como patógenos parasitarios) incluyen, pero sin limitación: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*.

Se conocen bien proteínas inmunogénicas codificadas por microorganismos patógenos y/o pueden determinarse por los expertos en la materia. Por lo tanto, el antígeno específico codificado por el vector de CMV recombinante puede ser cualquier proteína o fragmento de la misma (tal como un epítipo o fragmento antigénico del mismo) que se expresa específicamente por el patógeno y es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

En algunas realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno de un virus. Los virus pueden incluir pero sin limitación virus de la gripe, virus del Nilo Occidental, Poliovirus, VIS, VIH, CMVH, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi, virus del Ébola, virus de chikungunya, virus del Dengue, virus de la viruela del mono, virus de la varicela zóster, virus de Epstein-Barr, virus del Herpes simple 1 y virus del Herpes simple 2. En realizaciones particulares desveladas en el presente documento, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno de virus de la gripe. En algunos ejemplos, el antígeno del virus de la gripe es hemaglutinina (HA) o neuraminidasa o un epítipo o fragmento antígeno del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno del virus de la viruela del mono. En algunos ejemplos, el antígeno del virus de la viruela del mono es A35R, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno del virus del Nilo Occidental. En algunos ejemplos, el antígeno del virus del Nilo Occidental es cápside (C), membrana (prM/M), envoltura (E), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B o NS5, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno del virus de chikungunya. En algunos ejemplos, el antígeno de virus de chikungunya es cápside (C), glucoproteína de la envoltura 1 (E1), glucoproteína de la envoltura 2 (E2), glucoproteína de la envoltura 3 (E3) o proteína no estructural 1 (NSP1), o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno del virus del Ébola. En algunos ejemplos, el antígeno del virus del Ébola es nucleoproteína (NP), o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno de VHC. En algunos ejemplos, el antígeno del VHC es núcleo, E1, E2, NS2, NS3, NS4 o NS5, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno de poliovirus. En algunos ejemplos, el antígeno de poliovirus es VP1, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otras realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno de un virus del dengue, tal como un virus del dengue de serotipo 1, 2, 3 o 4. En algunos ejemplos, el antígeno del virus del dengue es cápside (C), membrana (prM/M), envoltura (E), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B o NS5, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo.

En algunas realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno bacteriano. En realizaciones particulares, el antígeno es de *Clostridium tetani*, el agente causante del tétanos. En algunos ejemplos, el antígeno de *Clostridium tetani* es tétanos c, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. El tétanos C es un fragmento no tóxico de la toxina del tétanos que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora a la toxina del tétanos.

En algunas realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno fúngico.

En algunas realizaciones, el vector de CMV recombinante codifica un antígeno protozoario. En realizaciones particulares, el antígeno protozoario es un antígeno *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* o

Plasmodium malariae, cada uno de los cuales puede provocar malaria (siendo *Plasmodium falciparum* el agente causante más común para la malaria). En algunos ejemplos, el agente de *Plasmodium* es un antígeno pre-eritrocítico, tal como CSP o SPP2 o un epítipo o fragmento antigénico del mismo. En otros ejemplos, el antígeno de *Plasmodium* es un antígeno eritrocítico, tal como AMA1 o MSP1, o un epítipo o fragmento antigénico del mismo.

En otras realizaciones, el polinucleótido heterólogo portado por el vector de CMV recombinante codifica un polipéptido derivado de un tumor. El tumor puede ser el resultado de cualquier tipo de enfermedad o afección proliferativa celular, y puede ser benigno o maligno. En ejemplos particulares el tumor es canceroso. Dichos tumores pueden ser de cualquier tipo de cáncer incluyendo, pero sin limitación: leucemias, incluyendo leucemias agudas (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), síndrome mielodisplásico y mielodisplasia, policitemia vera, linfoma, (tal como enfermedad de Hodgkin, todas las formas de linfoma no de Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada. Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen, pero sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer del cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de la vejiga, melanoma y tumores del SNC (tales como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, meningioma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Los polipéptidos derivados de tumores antigénicos que pueden estar codificados por el polinucleótido heterólogo de las composiciones y los métodos descritos abarcan polipéptidos también conocidos como antígenos asociados a tumor (AAT), y péptidos derivados de los mismos. Se han identificado muchos AAT. Estos incluyen, pero sin limitación: transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), survivina, MAGE-1, MAGE-3, gonadotropina coriónica humana, antígeno carcinoembrionario, fetoproteína alfa, antígeno oncofetal pancreático, MUC-1, CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 549, CA 195, antígeno de membrana específico de próstata, Her2/neu, gp-100, trp-2, proteínas K-ras mutantes, p53 mutante, receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado, proteína quimérica p120BCR-ABL; proteína E7 o virus del papiloma humano, proteína EBNA3 del virus de Epstein-Barr, antígeno carcinoembrionario (ACE), gonadotropina β-coriónica humana, alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, hsp70-2 mut, M-CSF, prostasa, antígeno específico de próstata (AEP), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostateína, PSMA, telomerasa, antígeno de tumor de carcinoma de próstata 1 (PCTA-1), ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinaB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina (algunos de estos AAT así como otros se describen en Novellino *et al.*, Cancer Immunology and Immunotherapy, 54: 187-207, 2005).

Se muestra a continuación en la Tabla 2 una lista de antígenos tumorales ejemplares y sus tumores asociados.

Tabla 2: tumores ejemplares y sus antígenos tumorales

Tumor	Antígenos asociados a tumor
Leucemia mielógena aguda	Tumor de Wilms 1 (WT1), antígeno expresado preferentemente de melanoma (PRAME), PR1, proteinasa 3, elastasa, catepsina G
Leucemia mielógena crónica	WT1, PRAME, PR1, proteinasa 3, elastasa, catepsina G
Síndrome mielodisplásico	WT1, PRAME, PR1, proteinasa 3, elastasa, catepsina G
Leucemia linfoblástica aguda	PRAME
Leucemia linfocítica crónica	Survivina
Linfoma no de Hodgkin	Survivina
Mieloma múltiple	NY-ESO-1
Melanoma maligno	MAGE, MART, Tiosinasa, PRAME GP100
Cáncer de mama	WT1, herceptina, antígeno de tumor epitelial (ATE)
Cáncer de pulmón	WT1
Cáncer ovárico	CA-125
Cáncer de próstata	AEP
Cáncer pancreático	CA19-9, RCAS1
Cáncer de colon	ACE
Carcinoma de células renales (CCR)	Factor de crecimiento de fibroblastos 5
Tumorales de células germinales	AFP

La inmunoterapia tumoral exitosa está obstaculizada por la escasa inmunogenia de epítopos tumorales y el hecho de que el sistema inmunitario con frecuencia responde a ellos mediante tolerancia inmunitaria en lugar de iniciando

una respuesta efectora potente. Una vacuna tumoral inmunoterapéutica ideal inducirá una respuesta inmunitaria que sea (a) robusta, (b) eficaz, (c) resistente al desarrollo de intolerancia inmunitaria, (d) de larga duración y (e) después del control tumoral inicial, eficaz en la tarea de la vigilancia inmunitaria contra reapariciones y metástasis. La respuesta inmunitaria de larga vida, robusta, inducida por infección por CMV, y la capacidad de CMV para superar la autotolerancia, sugieren que CMV puede ser un vector de vacuna ideal para inmunoterapia tumoral.

Los vectores de CMV recombinantes que codifican un antígeno tumoral, y composiciones de los mismos, pueden administrarse individualmente o administrarse en combinación con uno o más compuestos farmacéuticamente activos. Por ejemplo, los compuestos pueden coadministrarse con otros compuestos antineoplásicos tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, hormonas y sus antagonistas, otros agentes misceláneos o cualquier combinación de estos. Pueden administrarse agentes anti-neoplásicos adicionales antes de, al mismo tiempo, o después de la administración del vector de CMV recombinante.

Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas del nitrógeno (tales como mecloretanina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo o clorambucilo), alquil sulfonatos (tales como busulfano), nitrosureas (tales como carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina o dacarbazina). Los ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos de ácido fólico (tales como metotrexato), análogos de pirimidina (tales como 5-FU o citarabina) y análogos de purina, tales como mercaptopurina o tioguanina. Los ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca (tales como vinblastina, vincristina o vindesina), epipodofilotoxinas (tales como etopósido o tenipósido), antibióticos (tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina o mitomicina C) y enzimas (tales como L-asparaginasa). Los ejemplos de agentes misceláneos incluyen complejos de coordinación de platino (tales como cis-diamina-dicloroplatino II también conocido como cisplatino), ureas sustituidas (tales como hidroxurea), derivados de metil hidracina (tales como procarbazona) y supresores adrenocorticales (tales como mitotano y aminoglutetimida).

Los ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen adrenocorticosteroides (tales como prednisona), progestinas (tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de magesrol), estrógenos (tales como dietilestilbestrol y etinil estradiol), antiestrógenos (tales como tamoxifeno) y andrógenos (tales como propionato de testosterona y fluoximesterona). Los ejemplos de los fármacos quimioterapéuticos más habitualmente usados incluyen Adriamicina, Alkerano, Ara-C, BiCNU, Busulfano, CCNU, Carboplatino, Cisplatino, Citoxano, Daunorrubicina, DTIC, 5-FU, Fludarabina, Hidrea, Idarrubicina, Ifosfamida, Metotrexato, Mitramicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Mostaza de Nitrógeno, Taxol (u otros taxanos, tales como docetaxel), Velban, Vincristina, VP-16, mientras que algunos fármacos más recientes incluyen Gemcitabina (Gemzar), Herceptina, Irinotecano (Camptosar, CPT-11), Leustatina, Navelbina, Rituxan STI-571, Taxotere, Topotecano (Hicamtin), Xeloda (Capecitabina), Zevelina y calcitriol. Los ejemplos no limitantes de inmunomoduladores que pueden usarse incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos; Genetics Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg de Nueva Orleans, LA), SK&F 106528 y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech).

Para el tratamiento del cáncer, la administración de un vector de CMV recombinante que codifica un antígeno tumoral puede precederse de, o seguirse de, una o más terapias adicionales para tratar el cáncer, tal como resección quirúrgica del tumor o radioterapia.

También se desvelan en el presente documento vectores de CMV recombinantes, tales como vectores de CMVRh y CMVH, que tienen una supresión en uno o más genes que son esenciales para o aumentan la replicación, diseminación o propagación de CMV. Por lo tanto, estos vectores se denominan vectores de CMV "deficientes en replicación". Como se usa en el presente documento, "deficientes en replicación" abarca vectores de CMV que son incapaces de experimentar ninguna replicación en una célula hospedadora, o tienen una capacidad significativamente reducida capaz de experimentar replicación vírica. En algunos ejemplos, los vectores de CMV deficientes en replicación son capaces de replicar, pero son incapaces de diseminar ya que son incapaces de infectar células adyacentes. En algunos ejemplos, los vectores de CMV deficientes en replicación son capaces de replicar, pero son incapaces de propagarse ya que no se secretan de hospedadores infectados.

Se conocen bien en la técnica genes esenciales y de aumento de CMV (véase, por ejemplo, Dunn *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(24): 14223-14228, 2003; y Dong *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(21): 12396-12401, 2003), y se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el vector de CMVRh o CMVH recombinante incluye una supresión en un gen que es esencial para o aumenta la replicación, diseminación o propagación del virus. En otras realizaciones, el vector de CMVRh o CMVH recombinante incluye una supresión en múltiples (tales como, pero sin limitación, dos, tres o cuatro) genes esenciales para o que aumentan la replicación, diseminación o propagación de CMV. No es necesario que la supresión sea una supresión de la fase abierta de lectura completa del gen, sino que incluye cualquier supresión que elimine la expresión de la proteína funcional.

En algunas realizaciones, el vector de CMVRh o CMVH recombinante incluye una supresión en uno o más genes seleccionados de UL82 (que codifica pp71) (véase FIGs. 36-38), UL94 (que codifica la proteína UL94), UL32 (que codifica pp150), UL99 (que codifica pp28), UL115 (que codifica gL) y UL44 (que codifica p52), o un homólogo de los mismos (es decir, el homólogo de CMVRh de estos genes de CMVH).

Los vectores de CMVRh o CMVH deficientes en replicación desvelados en el presente documento pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, tal como un antígeno específico de patógeno o un antígeno tumoral. Como se desvela para otros vectores de CMVRh o CMVH recombinantes descritos en el presente documento, pueden usarse vectores de CMVRh o CMVH deficientes en replicación para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto contra el antígeno heterólogo codificado.

Un vector de CMVRh recombinante que tiene una supresión en el gen UL82 (que codifica la proteína pp71) está gravemente alterado en su capacidad para crecer *in vitro* y propagarse *in vivo*, pero aún induce una respuesta inmunitaria de linfocitos T robusta contra CMV. Por lo tanto, se contempla en el presente documento usar dicho vector deficiente en replicación como una vacuna contra CMV en sí mismo (véase FIGs. 36-38).

En realizaciones ventajosas de la presente invención, un vector de CMV recombinante, tal como un vector de CMVRh o un vector de CMVH puede tener supresiones en regiones génicas no esenciales para el crecimiento *in vivo*. Dichas regiones génicas incluyen, pero sin limitación, la familia RL11, la familia pp65, la familia US 12 y la familia US28. En particular, las regiones génicas de CMVRh que pueden suprimirse incluyen regiones génicas Rh13-Rh29, Rh111-RH112, Rh191-Rh202 y Rh214-Rh220. Más particularmente, las regiones génicas de CMVRh que pueden suprimirse incluyen Rh13.1, Rh19, Rh20, Rh23, Rh24, Rh112, Rh190, Rh192, Rh196, Rh198, Rh199, Rh200, Rh201, Rh202 y Rh220. En otra realización, las regiones génicas de CMVH que pueden suprimirse incluyen las regiones génicas RL11 (L), UL6, UL7 (L), UL9 (L), UL11 (E), UL83 (L) (pp65), US12 (E), US13 (E), US14 (E), US17 (E), US18 (E), US19 (E), US20 (E), US21 y UL28.

Pueden administrarse vectores de CMV recombinantes, o composiciones de los mismos, a un sujeto por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir virus recombinante o vectores víricos en un sujeto. Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, parenteral, intravenoso, subcutáneo, vaginal, rectal, intranasal, inhalación u oral. La administración parenteral, tal como administración subcutánea, intravenosa o intramuscular, se realiza en general por inyección. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Las soluciones y suspensiones de inyección pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. La administración puede ser sistémica o local.

Se administran composiciones que incluyen vectores de CMV recombinantes de cualquier manera adecuada, tal como con vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administre, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente divulgación.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas y no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente como sal de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico, o por reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.

La administración puede realizarse por dosis individuales o múltiples. La dosis administrada a un sujeto en el contexto de la presente divulgación debería ser suficiente para inducir una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto a lo largo de tiempo. La dosis requerida variará entre sujetos dependiendo de la especie, la edad, el peso y la condición general del sujeto, la gravedad de la infección que se trate, la composición particular que se use y su modo de administración. Un experto habitual en la materia puede determinar una dosis apropiada usando solamente experimentación rutinaria.

Se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de CMV recombinante solo o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. El vehículo y la composición pueden

ser estériles, y la formulación es apropiada para el modo de administración. La composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsiones o agentes tamponantes de pH. La composición puede ser una solución, suspensión, emulsión líquida, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Puede usarse cualquiera de los vehículos farmacéuticos habituales, tales como solución salina estéril o aceite de sésamo. El medio también puede contener materiales adyuvantes farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes y similares. Otros medios que pueden usarse con las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento son solución salina normal y aceite de sésamo.

Los vectores de CMV recombinantes descritos en el presente documento pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos para potenciar la antigenicidad. Por ejemplo, los vectores de CMV pueden administrarse con un adyuvante tal como un adyuvante incompleto de Freund o adyuvante completo de Freund.

Opcionalmente, pueden usarse una o más citocinas tales como IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α o IFN- γ , uno o más factores de crecimiento tales como GM-CSF o G-CSF; una o más moléculas tales como OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas, como adyuvantes biológicos (véase, por ejemplo, Salgaller *et al.*, 1998, J. Surg. Oncol. 68(2): 122-38; Lotze *et al.*, 2000, Cancer J. Sci. Am. 6(Supl 1): S61-6; Cao *et al.*, 1998, Stem Cells 16(Supl 1): 251-60; Kuiper *et al.*, 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465: 381-90). Estas moléculas pueden administrarse de forma sistémica (o localmente) al hospedador.

Se conocen varios medios para inducir respuestas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los lípidos se han identificado como agentes capaces de asistir en la sensibilización de CTL *in vivo* contra diversos antígenos. En ciertas realizaciones, el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, se contempla para la introducción de las composiciones de la presente divulgación en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones de la presente divulgación pueden formularse para suministro bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares.

Dichas formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o construcciones desvelados en el presente documento. La formación y uso de liposomas es conocida en general por los expertos en la materia. Se han desarrollado liposomas con estabilidad en suero y semividas en circulación mejoradas (Patente de Estados Unidos 5.741.516). Además, se han revisado diversos métodos de liposomas y preparaciones de tipo liposómico como vehículos farmacéuticos potenciales (Patente de Estados Unidos 5.567.434; Patente de Estados Unidos 5.552.157; Patente de Estados Unidos 5.565.213; Patente de Estados Unidos 5.738.868 y Patente de Estados Unidos 5.795.587).

Se han usado liposomas con éxito con varios tipos celulares que normalmente son resistentes a la transfección por otros procedimientos incluyendo suspensiones de linfocitos T, cultivos de hepatocitos primarios y células PC 12. Además, los liposomas están exentos de las restricciones de longitud de ADN que son típicas de sistemas de suministro basados en virus. Se han usado liposomas eficazmente para introducir genes, fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción y efectos alostéricos en una diversidad de líneas celulares cultivadas y animales. Además, se han completado varios ensayos clínicos exitosos que examinan la eficacia del suministro farmacológico mediado por liposomas. Además, varios estudios sugieren que el uso de liposomas no está asociado con respuestas autoinmunitarias, toxicidad o localización en las gónadas después de suministro sistémico.

Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapas concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilamelares (VML)). Las VML generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 μ m. La aplicación de ultrasonidos a VML da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (VUP) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los liposomas se asemejan a membranas celulares y se contemplan para su uso en relación con la presente divulgación como vehículos para las composiciones de vectores de CMV. Son bastante adecuados ya que pueden incluirse sustancias tanto solubles en agua como solubles en lípidos, es decir, en los espacios acuosos y dentro de la bicapa en sí misma, respectivamente. Es posible que los liposomas portadores de fármacos puedan incluso emplearse para el suministro específico de sitio de agentes activos modificando de forma selectiva la formulación liposómica.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a la alteración del tropismo del vector de CMVRh/VIS para evitar la replicación en células y tejidos asociada con propagación vírica y patogenicidad. El vector defectuoso en tropismo carece de genes requeridos para el crecimiento óptimo en ciertos tipos celulares o el vector se modifica para

contener dianas para micro-ARN específicos de tejido en genes que son esenciales para la replicación vírica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos elementos y/o realizaciones particulares. No debería interpretarse que estos ejemplos limiten la divulgación a los elementos o las realizaciones particulares descritos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vectores de CMVH y CMVRh recombinantes

Este ejemplo describe vectores de CMVH y CMVRh recombinantes ejemplares que codifican antígenos heterólogos, tales como antígenos específicos de patógenos o antígenos de cáncer. Aspectos particulares de la divulgación proporcionan vectores de CMVH y CMVRh recombinantes que son deficientes o tienen alteración en su capacidad para replicar *in vitro* e *in vivo*, diseminarse dentro del hospedador o propagarse entre hospedadores. Otros aspectos proporcionan vectores de CMVRh y CMVH cuyo crecimiento puede modularse *in vivo* (por ejemplo, mediante administración oral del antibiótico doxiciclina). La expresión de antígeno heterólogo puede estar bajo el control de promotores de diferentes clases cinéticas con respecto al ciclo de infección de CMV (por ejemplo, EF1 α -constitutivo; MIE-inmediato temprano; pp65 – temprano; gH – tardío).

En realizaciones particulares, los vectores de CMVRh y CMVH carecen de genes inmunomoduladores (por ejemplo, Rh158-166 y Rh182-189 (US2-11)) para potenciar la inmunogenia del vector, la seguridad y la capacidad del vector para portar genes heterólogos. Por ejemplo, el CMVH codifica al menos cuatro productos génicos diferentes, gpUS2, gpUS3, gpUS6 y gpUS11 que interfieren con la presentación de antígenos por el MHC I (27). Las cuatro moléculas de evasión del MHC de CMVH están codificadas en la región corta única del CMVH y pertenecen a la familia génica US6 relacionada. Los inmunomoduladores de CMVH adicionales incluyen, pero sin limitación, UL118, UL119, UL36, UL37, UL111a, UL146, UL147, etc. De forma similar, CMVRh contiene genes inmunomoduladores homólogos y análogos que pueden suprimirse o modificarse para potenciar la inmunogenia del vector, la seguridad y la capacidad de los vectores de vacuna desvelados para portar genes heterólogos.

En realizaciones adicionales, los vectores de CMVRh y CMVH recombinantes se optimizan adicionalmente para inmunogenia anti-patógenos o antitumoral mediante la inserción de múltiples genes de antígenos. Como alternativa, pueden usarse varios vectores, que tienen cada uno un único antígeno insertado, para co-administración.

En realizaciones adicionales, los vectores de CMVRh y CMVH recombinantes contienen sitios *LoxP* (por ejemplo, CMVRh/AntígenoLoxPCre) situados estratégicamente en el genoma de CMV para flanquear una región esencial del genoma vírico, en combinación con una Cre recombinasa regulada por tetraciclina (Tet). Después de la inmunización, la inducción mediada por doxiciclina (Dox) de Cre recombinasa permite la inactivación *in vivo* de CMVRh/AntígenoLoxPCre por escisión en los sitios de *LoxP*.

En realizaciones adicionales, el vector de CMVRh y CMVH recombinante incluye una supresión en uno o más genes que son esenciales para o aumentan la replicación del virus dentro de la célula infectada, diseminación dentro del hospedador y propagación entre hospedadores. Los ejemplos específicos de genes esenciales o de aumento incluyen, pero sin limitación, UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44, o un homólogo de los mismos. Se conocen en la técnica otros genes esenciales y se contemplan para su supresión en los vectores de CMVRh y CMVH desvelados (véase, por ejemplo, Dunn *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(24): 14223-14228, 2003; Dong *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(21): 12396-12401, 2003).

Construcción y caracterización del BAC del CMVRh

El desarrollo de la tecnología de BAC para clonar grandes segmentos de ADN genómico junto con sistemas de mutagénesis basados en fagos λ sofisticados han revolucionado el campo de la virología del herpes permitiendo enfoques genéticos para analizar el virus. Este sistema se usó, por ejemplo, para construir un BAC de CMVRh (CMVRh BAC-Cre) que contiene el genoma completa de la cepa de CMVRh 68-1. El CMVRh BAC-Cre se obtuvo de un virus recombinante CMVRh 68-1/EGFP infeccioso, patógeno (16). CMVRh BAC-Cre contiene un casete de BAC insertado en un único sitio *LoxP* dentro de la región intergénica *Rh181* (US1)/*Rh182* (US2) de CMVRh/*LoxP*. La inserción del casete de BAC en este sitio da como resultado la generación de secuencias de *LoxP* que flanquean el casete. Como el casete de BAC contiene un gen *Cre* que se expresa en células eucariotas, la transfección de este CMVRh BAC-Cre de "autoescisión" en fibroblastos da como resultado la escisión eficaz del casete de BAC, reconstituyendo el virus (designado CMVRh/*LoxP*). La caracterización del crecimiento del virus reconstituido por BAC (CMVRh/*LoxP*) *in vitro* e *in vivo* demuestra que las diversas manipulaciones genéticas no alteraron las propiedades WT del virus. La estructura genómica de CMVRh/*LoxP* es idéntica a la de CMVRh WT excepto por el sitio *LoxP* residual. La presencia de la secuencia de *LoxP* no altera los perfiles de expresión de genes adyacentes *Rh181* (US1) y *Rh182* (US2) o distantes (IE2). CMVRh/*LoxP* se replica con cinética WT tanto en cultivo tisular como en MR inmunocompetentes CMVRh seronegativos (n=2). El análisis de tejidos de un animal sacrificado a los 6 meses después de la inoculación demostró la presencia tanto de ADN de CMVRh como de células que expresaban IE1 en el bazo, lo que es coherente con la expresión génica persistente observada en estudios previos con virus WT. Ambos MR desarrollaron títulos de anticuerpos anti-CMVRh vigorosos comparables a los observados en los

animales infectados de forma natural. Tomadas juntas, estas observaciones demuestran que CMVRhvLoxP es fenotípicamente WT y es adecuado para construir alteraciones específicas de sitio para el desarrollo de vectores de vacuna.

5 Vectores de vacuna de CMVh y CMVRh ejemplares

La FIG. 15 representa esquemáticamente la construcción de vectores de vacuna de CMVRh y CMVh de acuerdo con aspectos particulares de la presente divulgación. Se insertan un antígeno o antígenos de patógenos heterólogos en cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de CMVRh o CMVh mediante recombinación E/T y mediada por Flp. El esquema muestra, por ejemplo, una estrategia generalizada para la inserción de un antígeno de patógeno marcado con epítipo en la región no codificante entre rh213 y Rh214 de CMVRh. Esta estrategia puede usarse de forma similar para inserción de antígenos de patógenos heterólogos en otros sitios definidos dentro del genoma del CMVRh/CMVh, así como la inserción de múltiples antígenos en sitios individuales o múltiples dentro del genoma. El gen que codifica el antígeno de patógeno marcado con epítipo se inserta en el genoma de BAC usando recombinación E/T. Después de la selección de BAC recombinantes basándose en la resistencia a antibióticos (tales como Kan), el gen de resistencia se retira mediante recombinación mediada por Flp. Se reconstituyen vectores de vacunas de CMVRh y CMVh recombinante mediante transfección de BAC recombinantes en células permisivas para CMVRh/CMVh (AgX, patógeno o antígeno de cáncer; Tag, marcador epítipo; pA, sitio de poliadenilación; Kan, gen de resistencia a kanamicina para la selección en bacterias).

La FIG. 16 muestra un vector de vacuna de "seguridad" de CMVRh/CMVh regulado por tetraciclina ejemplar. Este vector de seguridad de CMVRh/CMVh contiene dos componentes genéticos que interaccionan dentro del genoma de CMVRh/CMVh que juntos permiten la inactivación del vector inducida por Tet. Un gen de Cre recombinasa inducible por Tet (*Cre*) insertado dentro del genoma vírico permite la inducción de expresión de Cre recombinasa mediante el tratamiento con el homólogo de Tet, doxiciclina (Dox) (D). Este sistema regulado por Tet está comprendido por un transactivador inverso sensible a Tet (rtTA2^s-M2) (TA2), un transrepressor de Tet (*tTS-kid*) (TS) y una unidad promotora mínima de tetO₇-CMV (flecha blanca) que conduce la expresión de Cre-recombinasa. El segundo componente necesario para inactivación inducida por Tet es un par de sitios *LoxP* localizados dentro del genoma vírico para flanquear una región del genoma esencial para la replicación del virus (en este caso, Rh52-Rh156). En ausencia de Dox, la unión de *tTS-kid* y ausencia de unión de rtTA2^s-M2 con la unidad promotora mínima de tetO₇-CMV evita la expresión de Cre-recombinasa. En ausencia de Cre recombinasa, se mantiene la integridad del genoma de CMVRh/CMVh y el virus se replica con normalidad. La adición de Dox da como resultado la modulación alostérica de *tTS-kid* y rtTA2^s-M2 que da como resultado la activación de expresión de Cre recombinasa. La Cre recombinasa inactiva los vectores de vacuna de CMVRh/CMVh catalizando la escisión de la región del genoma vírico flanqueada por sitios *LoxP* (en este caso, Rh52-Rh156). Para mayor simplicidad, no se muestran los genes que expresan rtTA2^s-M2 y *tTS-kid*, así como el gen que expresa el antígeno de patógeno heterólogo.

La FIG. 17 muestra otro vector de vacuna de "seguridad" de CMVRh/CMVh regulado por tetraciclina ejemplar. Dichos vectores de vacuna de CMVRh/CMVh se construyen colocando un gen esencial para la replicación vírica, en este ejemplo factor de procesividad de ADN polimerasa *Rh70* (homólogo de CMVh-*UL44*) bajo el control del sistema inducible por Tet descrito en la FIG. 16. El homólogo de CMVh *Rh70* (*UL44*) se seleccionó inicialmente ya que se ha mostrado que este gen es esencial para la replicación de CMV (Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12396, 2003; Ripalti, J Virol. 69: 2047, 1995). Sin embargo, pueden usarse otros genes víricos esenciales como genes candidatos para regulación mediada por Tet. La regulación de expresión de *Rh70* o expresión de otros genes de CMVRh/CMVh esenciales por el sistema regulado por Tet permite el control de la replicación vírica variando el nivel de Dox. Para colocar el gen esencial bajo el control de Dox, la región cadena arriba 5' del gen se reemplaza con la unidad promotora mínima de *tetO₇-CMV* (flecha blanca). Después de inoculación de animales con vectores regulados por Tet en presencia de Dox, la replicación vírica puede inactivarse simplemente mediante la retirada de Dox. Se construyen vectores regulados por Tet mediante recombinación E/T y basada en Flp como se detalla en la FIG. 15.

La FIG. 18 muestra otro vector de vacuna de "seguridad" de CMVRh/CMVh regulado por tetraciclina ejemplar más. Dichos vectores de vacuna de CMVRh/CMVh se construyen de forma que contengan un gen citotóxico (CytoG) bajo el control del sistema inducible por Tet como se detalla en la FIG. 17. Después de inoculación de animales con vectores regulados por Tet en ausencia de Dox, la replicación vírica puede inactivarse rápidamente mediante inducción mediada por Dox del gen citopático lo que da como resultado la muerte de la célula infectada por el vector de vacuna.

En aspectos adicionales, se proporciona vectores de terapia génica de CMVRh y CMVh. La FIG. 19 representa esquemáticamente la construcción de vectores de terapia génica de CMVRh y CMVh ejemplares. El gen o los genes terapéuticos se insertan en BAC de CMVRh o CMVh mediante recombinación E/T y mediada por Flp. El esquema muestra una estrategia generalizada para inserción de un gen terapéutico marcado con epítipo en la región no codificante entre rh213 y Rh214 de CMVRh. Esta estrategia puede usarse de forma similar para inserción de genes terapéuticos en otros sitios definidos dentro del genoma de CMVRh/CMVh. El gen que codifica el gen de reemplazo marcado con epítipo se inserta en el genoma de BAC usando recombinación E/T. Después de la selección de BAC recombinantes basándose en la resistencia a antibióticos (en este caso, Kan), el gen de resistencia se retira mediante recombinación mediada por Flp. Se reconstituyen vectores de terapia génica de CMVRh y CMVh

recombinantes mediante transfección de BAC recombinantes en células permisivas para CMVRh/CMVH (ThG, gen terapéutico; Tag; marcador epitópico; pA, sitio de poliadenilación; Kan, gen de resistencia a kanamicina para selección en bacterias).

5 Ejemplo de referencia 2: Construcción de CMVRh/VISmac239gag

La presencia del sitio *LoxP* funcional individual en la región intergénica entre *Rh181 (US1)* y *Rh182 (US2)* de CMVRhV*LoxP* se aprovechó para utilizar un sistema de Cre recombinasa/*LoxP* para la construcción de un virus recombinante. Para este enfoque, se usó un plásmido pVISmac239gag como una fuente de molde para
10 amplificación por PCR del casete VISmac239gag. El casete VISmac239gag contiene el promotor de EF1 α celular que conduce la expresión del gen VISmac239gag. El promotor EF1 α es un promotor altamente activo que está activo de forma constitutiva en todos los tipos celulares ensayados y se espera que dé como resultado expresión independiente del tipo celular alta del gen *gag*. La amplificación por PCR se realizó usando cebadores diseñados para incorporar un único sitio *LoxP* en uno de los extremos del casete VISmac239gag amplificado. Para
15 recombinación, el producto de PCR que contiene el casete VISmac239gag flanqueado por sitios *LoxP* se transfirió en fibroblastos de MR. A las 24 horas después de la transfección, estas células se infectaron con CMVRhV*LoxP* a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Se permitió que la infección progresara hasta que se observó un efecto citopático extensivo. En este momento, se recogieron células infectadas por virus y se usaron para infectar fibroblastos nuevos, que después se superpusieron con agarosa para evitar la propagación vírica a través del cultivo. Después de aproximadamente dos semanas, se seleccionaron placas víricas individuales, y cada placa se usó para infectar fibroblastos nuevos. Después se exploraron lisados celulares totales con respecto a la presencia del VISmac239gag mediante PCR. Después se sometieron a ultrasonidos lisados celulares positivos para VISmac239gag, se diluyeron en serie y se usaron para infectar fibroblastos nuevos. El proceso se repitió tres veces, después de lo cual se exploraron clones de virus purificados por placas con respecto a expresión del gen *gag*
20 mediante análisis de transferencia de northern de ARN total obtenido de células infectadas. La presencia de expresión de la proteína gag se confirmó mediante análisis de western así como inmunofluorescencia en células endoteliales (CE) y macrófagos derivados de monocitos (MDM). El casete VISmac239gag completo se secuenció para confirmar la integridad de la secuencia del casete insertado. La cinética de crecimiento de clones *gag* positivos se comparó con el virus WT y se seleccionó un único virus recombinante para CMVRh/VISmac239gag con
25 características de crecimiento WT y altos niveles de expresión de gag.
30

El día 224 después de la infección primaria, se administró por vía subcutánea CMVRh/VISmac239gag a una cohorte de 4 MR CMVRh seropositivos. Como se ha observado previamente en estudios de reinfección, la PCR en tiempo real no detectó CMVRh, ni WT ni CMVRh/VISmac239gag, en células mononucleares de sangre o de lavado
35 pulmonar en ningún punto temporal después de la inoculación vírica. Sin embargo, la orina del día 127 después de la reinfección era débilmente positiva para expresión de gag mediante ELISA lo que sugiere la presencia de CMVRh/VISmac239gag. Estas muestras se co-cultivaron para aislar CMVRh, y estas preparaciones víricas derivadas *in vivo* se evaluaron con respecto a expresión génica mediante transferencia de western. Como se muestra en la FIG. 8, los cocultivos de CMVRh de los 4 animales expresaron gag, estableciendo definitivamente la presencia de virus CMVRh/VISmac239gag en estos sitios secretorios epiteliales. El análisis retrospectivo de la orina en puntos temporales después de reinfección más tempranos reveló la presencia del vector de CMVRh que expresa gag en orina el día 7 en un MR y el día 21 en los otros 3 animales. Además, también estaba presente CMVRh que expresaba gag en saliva, y permaneció presente en orina al menos hasta el día 237 después de la reinfección. De forma significativa, la reinfección de este clon de CMVRh/VISmac239gag indujo una respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de gag, orientada a la mucosa, así como una respuesta de anticuerpos específicos de gag
40 (véase FIGs. 10, 11 y 12). Estos datos demuestran inequívocamente que CMV es capaz de reinfectar sujetos inmunitarios, cumpliendo eficazmente con virus WT preexistentes, y estableciendo infección en sitios normales dentro del hospedador, a pesar de una inmunidad celular y humoral fuertemente reforzada dirigida a CMV. También demuestran la alta estabilidad *in vivo* de vectores de CMVRh que expresan antígenos heterólogos exógenos, lo que sugiere que estos vectores pueden ser capaces de infectar de forma persistente sujetos inoculados y mantener indefinidamente la expresión de los genes codificantes de antígeno exógeno, insertados. Finalmente, demuestran que CMVRh recombinante puede inducir respuestas tanto de linfocitos T como de Ab a proteínas exógenas en el escenario de reinfección, y por lo tanto tiene el potencial de actuar como un vector de vacuna eficaz en individuos con inmunidad a CMV pre-existente.
50
55

Ejemplo 3: Vectores de CMV que codifican VP1 de poliovirus, tétanos C, hemaglutinina de gripe H5N1 y nucleoproteína (NP) del virus del Ébola.

Este ejemplo describe la expresión *in vitro* de antígenos heterólogos codificados por un vector de CMV murino (CMVM) recombinante e inducción de linfocitos CD8+ específicos de antígeno en animales vacunados. Los CMV muestran especificidad de especie estricta con la mayoría de especies de mamífero que tienen su propio CMV único. Sin embargo, todos los CMV comparten características comunes de crecimiento, citopatología, tropismo tisular y una capacidad para establecer infección persistente y latente. La similitud en la biología de CMV ha permitido el uso de infección por CMV de animales no humanos, tal como infección por CMV murina de ratones e infección por CMV de rhesus de macacos rhesus, como modelos *in vivo* de enfermedad humana. Por lo tanto, el modelo de ratón de CMVM se usa habitualmente como un modelo *in vivo* para CMVH. En consecuencia, este
60
65

ejemplo proporciona prueba de concepto para uso de vectores de CMV recombinantes (tales como vectores de CMVRh y CMVH) para la expresión de antígenos heterólogos y uso de los vectores para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

- 5 Se ha descrito el plásmido de BAC de CMVM usado en los siguientes experimentos para generar vectores de CMVM recombinantes que codifican un antígeno heterólogo (Wagner *et al.*, J. Virol. 73: 7056-7060, 1999).

Se amplificó por PCR ADN que codificaba VP1 de poliovirus a partir de ácido nucleico de poliovirus y se clonó en el plásmido de BAC de CMVM para generar pCMVM-VP1. La proteína VP1 también se marcó con un epítipo pequeño en el extremo carboxilo terminal para facilitar la detección. El pCMVM-VP1 se transfectó en fibroblastos embrionarios murinos (MEF) para reconstituir virus CMVM-VP1. Se infectaron MEF con virus CMVM-VP1. Después de aproximadamente 3 días, las células se recogieron y se separó proteína aislada en un gel de poliacrilamida. Se realizó transferencia de Western usando un anticuerpo contra el marcador epitópico. Basándose en la reactividad del marcador epitópico y el peso molecular predicho, los resultados demostraron que VP1 de polivirus se expresaba eficazmente en MEF infectados con CMVM-VP1. Se describen adicionalmente aspectos de esta realización de la invención en el Ejemplo 6.

La HA de gripe aviar (cepa Viet04) H5N1 se clonó en el plásmido de BAC de CMVM para generar pCMVM-HA. La proteína HA se marcó con epítipo para facilitar el análisis de la expresión. El virus CMVM-HA se reconstituyó como se ha descrito anteriormente. Se usó virus CMVM-HA para infectar MEF. Después de aproximadamente 3 días, las células se recogieron y se separó la proteína aislada en un gel de poliacrilamida. Se realizó transferencia de Western usando un anticuerpo contra el marcador epitópico. Basándose en la reactividad del marcador epitópico y el peso molecular predicho, los resultados demostraron que HA se expresaba eficazmente en MEF infectados con CMVM-HA.

Se fusionó un epítipo de linfocitos T de NP de virus del Ébola con el gen no esencial IE2 de CMVM para generar la construcción pCMVM-EBOV-NP_{CTL}. El virus CMVM-EBOV-NP_{CTL} se reconstituyó en MEF. Se inmunizaron diez ratones i.p. con CMVM-EBOV-NP_{CTL} el día 1 y se reforzaron en la semana 4. Se recogieron esplenocitos en la semana 8 para evaluar el número de linfocitos T CD8+ específicos de NP usando tinción con citocina intracelular (TCI). Brevemente, se incubaron esplenocitos en presencia de antígeno diana (NP) y brefeldina A durante 6 horas. El porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos de NP se determinó mediante citometría de flujo basándose en la expresión de citocinas efectoras. Para ratones individuales, el porcentaje de linfocitos T CD8+ totales específicos para NP varió de aproximadamente 1-10 %, lo que demuestra que la inmunización con CMVM-EBOV-NP_{CTL} era extremadamente eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica de NP. Esta realización de la invención se describe adicionalmente en el Ejemplo 7.

Sumario: estos resultados demuestran que los vectores de CMV recombinantes que codifican un antígeno heterólogo (bien la proteína de longitud completa entera o un epítipo individual) son capaces de expresar eficazmente el antígeno heterólogo en células infectadas, e inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T fuerte al antígeno heterólogo.

Ejemplo de referencia 4: CMVRh recombinante que codifica el antígeno del virus de la viruela del mono A35R.

Este ejemplo describe un vector de CMVRh recombinante que codifica el antígeno del virus de la viruela del mono A35R y respuestas de linfocitos T específicos de A35R en macacos rhesus (MR) vacunados con el vector de virus recombinante. Se vacunaron MR con CMVRh que expresaba A35R, y se recogió líquido de BAL los días 7, 14 y 21 después de la vacunación para análisis de linfocitos T en el pulmón (un sitio efector de mucosa accesible). Se evaluaron respuestas de memoria tanto central (CM) como efectora (EM) CD4+ y CD8+ específicas para A35R mediante TCI como se ha descrito anteriormente (pero usando péptidos A35R). El día 14, se observó un aumento significativo en el número de linfocitos T específicos de A35R CM y EM (tanto CD4+ como CD8+) en el animal vacunado.

Ejemplo 5:

Se describe la generación de una vacuna de VIS eficaz usando un diseño de vector de CMVRh que está altamente atenuado y es suficientemente seguro para traslación a seres humanos. Un enfoque toma la vía más directa para la atenuación del vector modificando técnicamente vectores en general deficientes en replicación, pero el requisito de replicación del vector de CMV para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra VIS aún no está claro. Un enfoque complementario genera vectores de CMVRh/VIS que están atenuados para replicación solamente en tejidos diana específicos que están asociados con la enfermedad y la diseminación de CMV, pero que aún pueden inducir respuestas inmunitarias protectoras de VIS si la replicación vírica es un componente necesario para esta inmunidad. Una de las características clave de la infección por CMVRh/CMVH primaria es que los individuos diseminan virus del tejido glandular tal como glándulas salivales así como excretan virus a la orina (Pass, R.F. 2001. Cytomegalovirus. En Fields Virology. P.M.H. David M. Knipe, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb Malcolm A. Martin, Bernard Roizman y Stephen E. Straus, editor. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins. 2675-2705).

Se considera que las células epiteliales infectadas que revisten los conductos de las glándulas salivales y el tracto urinario o el riñón son fuentes persistentes de virus en estos tejidos. En primer lugar, se modifica técnicamente un vector de CMVRh/VIS que tiene todos los genes conocidos implicados en el tropismo de células epiteliales retirados de la cadena principal de CMVRh. La prevención de la replicación del virus en ese tipo celular puede reducir significativamente la diseminación de CMVRh de estos tejidos así como la patogenia en MR sin pérdida de inmunidad protectora de VIS. La alteración del tropismo a células epiteliales de CMVRh puede atenuar significativamente el vector de vacuna en MR, pero sigue existiendo la posibilidad de que en el contexto de infección fetal el vector aún pueda ser capaz de diseminarse y provocar enfermedad del SNC. Por lo tanto, una realización adicional de la invención se refiere a asegurar la seguridad del vector alterando su capacidad para replicar en SNC y tejido mieloide usando un enfoque novedoso basado en miARN específicos de tejido para inactivar genes de CMVRh esenciales necesarios para la producción de virus infeccioso. La vacuna de CMVRh/VIS última generada en estos estudios puede incluir una combinación de estos defectos de tropismo dependiendo de las características de las respuestas de linfocitos T específicas de VIS observadas con las inactivaciones de tropismo individual.

La generación y caracterización de un vector de CMVRh/VIS completamente deficiente para replicación en células epiteliales por supresión de genes de tropismo. CMVRh y CMVH se replican en muchos tipos celulares diferentes incluyendo células epiteliales y endoteliales, macrófagos, neuronas, células endoteliales, así como fibroblastos (que es la célula prototípica para el crecimiento del virus *in vitro*). Estudios de mutagénesis de CMVH y CMVRh han revelado varios genes víricos que no son esenciales para la replicación en fibroblastos, pero que determinan el tropismo del virus para otros tipos celulares. Por ejemplo, se ha observado que los genes UL128-131A de CMVH son críticos para la entrada vírica en células epiteliales y endoteliales, pero no fibroblastos como se ha descrito anteriormente. El vector de CMVRh usado para la construcción de construcciones de CMVRh/VIS (68-1) tiene mutaciones en el grupo de genes de UL128-131A y presenta replicación reducida en células epiteliales pigmentarias retinianas de MR (RRPE). Esta replicación reducida en células RRPE resulta de la pérdida de homólogos de CMVRh de UL128 de CMVH y el segundo exón de UL130. Aunque 68-1 aún es capaz de infectar células epiteliales, la reparación de las mutaciones de UL128 y 130 da como resultado un aumento de 2-3 log en la replicación vírica en estas células. De forma coherente con la función de estos genes en el tropismo epitelial, CMVRh 68-1 muestra diseminación reducida a la orina y la saliva de sitios epiteliales normales de replicación persistente en MR adultos sanos. Resulta importante que este "experimento de la naturaleza" indica que la dirección de genes de tropismo epitelial es una estrategia eficaz por la que atenuar la capacidad de los vectores de CMV para diseminarse manteniendo al mismo la eficacia de la vacuna. La presencia de 4 genes de tropismo a células epiteliales adicionales en CMVRh (Rh01 Rh159, Rh160 y, Rh203) puede explicar la capacidad de 68-1 para conservar una capacidad residual para replicarse en células epiteliales. La mutación de estos genes da como resultado defectos de replicación de graves (reducción >4 log) a moderados (reducción de 1-2 log) en células epiteliales pero no en fibroblastos. Ya que la inactivación de UL128 y 130 de CMVRh tiene un efecto en la capacidad del virus para infectar células epiteliales y diseminarse a partir de MR infectados, la eliminación de los genes de tropismo a células epiteliales restantes puede anular completamente la infección de células epiteliales y eliminar la diseminación vírica. La eliminación del tropismo a células epiteliales puede atenuar gravemente la patogenia del virus *in vivo*, especialmente la capacidad del virus para provocar enfermedad asociada a epitelio tal como neumonía. Por lo tanto, las realizaciones de la invención se refieren a un vector de CMVRh/VIS que tiene replicación reducida en células epiteliales por supresión de estos 4 genes de tropismo epitelial adicionales del genoma de CMVRh 68-1. Este vector se designa CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) o (retanef) y se va a usar para estudios *in vivo*.

La construcción de un vector de CMVRh/VIS con supresión de todos los genes de tropismo epitelial conocidos [designado CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) o (retanef)] requiere múltiples ciclos de recombinación lineal para dirigirse individualmente a los cuatro genes de tropismo restantes dentro del genoma del BAC 68-1 (que ya tiene supresión de UL128 y UL130). Al mismo tiempo, se inserta de forma recíproca un casete que expresa gag de VIS o retanef con un marcador epitópico definido bajo el control del promotor EF1α en el genoma durante la supresión de la primera fase abierta de lectura (ORF) de tropismo epitelial (Rh01). Para permitir ciclos repetidos de supresión, se usa una modificación del protocolo de recombinación lineal de dos etapas convencional que usa galactocquinasa (*galK*) como el marcador seleccionable (Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A., y Copeland, N.G. 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acids Res* 33:e36).

Resulta importante que este sistema modificado no deja ninguna "cicatriz" de ADN de secuencia heteróloga de acción en *cis* dentro del genoma de BAC que interferiría con ciclos posteriores de recombinación. En la primera etapa de recombinación, se transforman bacterias recombinantes (SW102) que contienen el BAC de CMVRh (68-1) con un producto de PCR comprendido por *galK* y resistencia a kanamicina (*KanR*) flanqueado por secuencia homóloga al sitio deseado de recombinación dentro del genoma de CMVRh. SW102 son auxótrofos de galactosa (debido a la supresión del gen *galK* del operón de galactosa) y crecen en placas que contienen galactosa como la única fuente de carbono y la kanamicina permite la selección de clones de BAC que tienen incorporado el producto de PCR (y *galK/KanR*) dentro del genoma.

En la segunda etapa de recombinación, el casete de *galK/KanR* se reemplaza con un oligonucleótido o producto de PCR con homología de secuencia con el sitio de recombinación que flanquea la supresión deseada. Las bacterias se cultivan en placas que contienen 2-desoxi-galactosa, un sustrato tóxico en presencia de *galK*, dando como

resultado en ausencia de kanamicina la contraselección de clones de BAC que han perdido el marcador *galk/KanR*, y contienen solamente la supresión deseada. Este método se usa para suprimir secuencialmente Rh159, Rh160 y Rh203 hasta que todos los genes de tropismo a células epiteliales se han suprimido del vector de CMVRh/VIS. En paralelo para reducir los números de animales necesarios para ensayar la inmunogenia de los vectores de CMVRh/VIS se construyen vectores similares de CMVRh que carecen de los genes de tropismo a células epiteliales pero que codifican VIS retanef con un casete de expresión de marcador epitópico V5 (2) en lugar del casete de expresión de gag [CMVRhΔEpiCMAX/VIS(retanef)].

Reconstitución de virus CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) y (retanef): para reconstituir virus, se transfectaron BAC en fibroblastos de rhesus (RF) primarios. Después de aproximadamente dos semanas, se espera que las placas se hagan visibles y se recupera el virus. El virus se purifica adicionalmente por tres ciclos de purificación en placas para asegurar la retirada del casete de BAC y la eliminación de cualquier contaminación residual con CMVRh de tipo silvestre. La retirada del casete de BAC se confirma mediante PCR y transferencia de southern de ADN genómico aislado de virus recuperado. La expresión de gag y expresión de la proteína retanef se confirma para asegurar que los niveles de expresión de antígeno diana son comparables a vectores WT. El crecimiento de CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) y (retanef) se compara con CMVRh de tipo silvestre para crecimiento tanto en RF (evaluación de la capacidad de crecimiento básica) como en células epiteliales.

Además de RRPE, pueden usarse células epiteliales de riñón de MR primario para esta caracterización. También se evalúa el crecimiento en macrófagos y células endoteliales microvasculares ya que estos genes pueden afectar al crecimiento de virus en esos tipos celulares. Un vector de CMVRh que conserva el crecimiento normal en fibroblastos *in vitro* pero está comprometido al máximo con respecto a crecimiento en células epiteliales se ensayará con respecto a inmunogenia y atenuación en animales. Si la replicación vírica también se altera en macrófagos o en células endoteliales, una realización de la invención se refiere a mutaciones que muestran falta de replicación solamente en células epiteliales. Ya que los cuatro genes epiteliales individuales pueden suprimirse secuencialmente en la construcción de CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) y (retanef), cualquier vector que muestre reducción de la replicación en fibroblastos o tipos celulares no epiteliales adicionales se identifica rápidamente en el estadio de su construcción durante la posterior caracterización del crecimiento *in vitro*. El vector de CMVRh que está suprimido al máximo para el mayor número de ORF de tropismo epitelial, sin afectar el crecimiento de fibroblastos se designa CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) o (retanef) y se usa para los estudios de MR *in vivo*.

Las realizaciones de la invención se refieren a la generación y caracterización de vectores de CMVRh/VIS que son deficientes para replicación en tejido epitelial, neuronal y mielode mediante inserción de secuencias diana de miARN específico de tejido en las 3'UTR de genes de CMVRh esenciales.

Una de las preocupaciones principales del uso de la vacuna de VIH basada en CMVH de tipo silvestre es el potencial para enfermedad en fetos, niños y adultos inmunocomprometidos. CMVH puede provocar una diversidad de enfermedades en estos individuos incluyendo anomalías del SNC, neuropatía periférica, retinitis y neumonía Pass, R.F. 2001. Cytomegalovirus. En Fields Virology. P.M.H. David M. Knipe, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb Malcolm A. Martin, Bernard Roizman y Stephen E. Straus, editor. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins. 2675-2705). La pérdida de tropismo a células epiteliales en vectores de CMVRh puede atenuar el desarrollo de neumonía y retinitis aunque la enfermedad del SNC sigue siendo una preocupación importante. La enfermedad del SNC es una preocupación importante durante la infección congénita que puede conducir a hidrocefalia, malformación del cerebro y sordera. Se ha mostrado que la inserción de secuencias dianas de miARN específicas de tejido en el genoma de polivirus es extraordinariamente eficaz en la atenuación de la replicación vírica en el cerebro y la mortalidad en ratones proporcionando un nuevo enfoque para desarrollo en vacunas. De forma similar, la inserción de dianas de miARN en el genoma de la gripe también inactiva el virus en tejidos.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a evitar específicamente la replicación de CMV en macrófagos dirigiéndose a un gen esencial del virus con un miARN hematopoyético. La funcionalidad de este enfoque se ha demostrado para CMVM donde la expresión del gen de IE3 esencial se atenuó mediante miR 143 3p (FIGs. 21-25). La utilidad de este enfoque para dirigir ARNm de genes esenciales de CMV para destrucción por miARN celulares se describe en el presente documento. Resulta importante que los miARN están altamente conservados entre ratones y seres humanos (y por lo tanto MR) haciendo este enfoque factible para otras especies (Larke, R.P., Wheatley, E., Saigal, S., y Chernesky, M.A. 1980. Congenital cytomegalovirus infection in an urban Canadian community. J Infect Dis 142: 647-653). Se utiliza un enfoque similar para construir vectores de CMV atenuados con respecto al crecimiento en el SNC mediante el uso de miARN específicos de neuronas.

Otra característica de la enfermedad de CMV es la diseminación del virus a órganos y se considera que esta está mediada por macrófagos. Se considera que los macrófagos y las células endoteliales son sitios de persistencia de CMV en el hospedador de modo que la eliminación de uno de los depósitos del virus debería permitir aún persistencia del virus (Jarvis, M.A., y Nelson, J.A. 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. Curr Opin Microbiol 5: 403-407). Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención se refieren a dirigirse a replicación mielode para evitar la diseminación sistémica del CMV. Un candidato a vector de CMV óptimo tendrá inmunogenia de tipo silvestre, estando al mismo tiempo atenuado al máximo para replicación en la diversidad más amplia de diferentes tipos celulares. Se generan vectores con inactivación tisular de

CMV para evitar la replicación en los siguientes tejidos: SNC, hematopoyético, SNC/epitelial, SNC/hematopoyético, epitelial/hematopoyético y SNC/hematopoyético/epitelial.

Se generan y ensayan características de tropismo tisular *in vitro* de los virus con inactivación tisular del SNC (CMVRhΔC/VIS) y hematopoyética (CMVRhΔH/VIS). El número de MR para estudios de inmunogenia puede conservarse preparando inactivaciones de tropismo tisular con VIS gag, CMVRh/VIS(gag) y la proteína de fusión de rev, tat y nef del VIS, retanef, CMVRh/VIS(retanef) como se ha descrito previamente. La construcción de estos vectores es la siguiente:

CMVRhΔC/VIS(gag) y (retanef): para generar una vacuna de CMVRh/VIS que no puede replicarse en el SNC, se insertan 4 secuencias diana repetidas (cuatro 21meros) con complementariedad exacta con el miR-124 neuronal en la secuencia de 3'UTR del gen esencial de CMVRh gen IE2 (Rh156 Ex5) de los vectores de CMVRh/VIS. miR-124 en ratón, MR y ser humano están conservados al nivel de nucleótidos (5'UAAGGCACGCGGUGAAUGCC3') (como se describe adicionalmente en el sitio de web de miRBase, la base de datos de microARN). Para asegurar una anulación completa de la replicación vírica en este tejido, las secuencias diana de miR-124 se insertan en la 3'UTR del gen de ADN helicasa (Rh142). Para IE2 la secuencia diana de miR-124 se insertan 18 pares de bases cadena abajo de la ORF, que es de hecho el punto medio de la 3'UTR basándose en la señal de poliadenilación predicha AATAAA o 78 pares de bases cadena abajo de Rh142 utilizando tecnología de BAC descrita anteriormente.

En cada caso se evitan ORF solapantes para minimizar la posibilidad de atenuación no específica del virus. Una vez contruidos, cada uno de los virus se ensaya con respecto a los niveles de expresión génica del gen diana y atenuación del crecimiento vírico en fibroblastos transfectados de forma estable con construcciones inducibles que expresan cada uno de los miARN específicos de tejido. Los niveles de expresión de ARN se ensayan mediante RT-PCR mientras que los niveles de expresión de proteínas de los genes diana se supervisan mediante análisis de transferencia de western. El crecimiento vírico se determina mediante curvas de crecimiento de una etapa y multietapa, comparando los virus que contienen la diana de miARN frente a los virus de control en cultivos primarios de cultivos neuronales fetales de MR en comparación con RF. Se ha mostrado que el CMVH se replica en células neuronales *in vitro* (Luo, M.H., Schwartz, P.H., y Fortunato, E.A. 2008. Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. J Virol 82: 9994-10007). Están disponibles cultivos neuronales primarios de tejido cerebral de MR fetal para aislar células endoteliales capilares de cerebro con los solicitantes. Se ensayan virus que muestran crecimiento en RF pero no cultivos neuronales con respecto a patogenia en así como la respuesta de linfocitos T.

CMVRhΔC/VIS(gag) y (retanef): para generar un vector de CMVRh/VIS que no pueda replicarse en macrófagos, se insertan cuatro 21meros con complementariedad exacta para la célula hematopoyética miR-143-3p en las 3'UTR de dos genes tardíos esenciales de CMVRh: gH (Rh104) el receptor de glucoproteína esencial y proteína de la cápsida menor (Rh117). La secuencia de miR-143-3P para ratón, MR y ser humano está conservada al nivel de nucleótidos (5'UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA3') (como se describe adicionalmente en el sitio de web de miRBase, la base de datos de microARN). Para gH el sitio diana de miR-143-3p se sitúa 114 pb cadena abajo de la ORF antes de la secuencia de poli A, y para Rh117 la secuencia diana está 30 pb cadena abajo de la ORF. Ya que Rh111, 112, 114 y 118 usan la misma señal de poliadenilación AATAAA que Rh117, se espera que todos estos transcritos se inactiven en macrófagos aumentando de este modo la eficacia del bloque de replicación vírica.

Los genes tardíos esenciales de CMVRh se dirigen a prevenir la producción de virus infeccioso, pero permiten la expresión de los antígenos gag y retanef de VIS en macrófagos para permitir que la presentación de antígenos gag y retanef apropiada conserve la inmunogenia de vector de vacuna. Se ensayan virus que muestran crecimiento en RF pero no macrófagos para patogenia así como respuesta de linfocitos T. Se preparan macrófagos a partir de sangre periférica de MR como se ha descrito previamente (Söderberg-Naucler, C., Fish, K.N., y Nelson, J.A. 1997. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. Cell 91: 119-126).

Junto con el ensayo de vectores de CMVRh/VIS deficientes en tropismo individuales, las realizaciones de la invención se refieren a la construcción de los vectores de CMVRh deficientes en tropismo múltiples con gag y retanef que combinan los elementos de los tropismos deficientes epitelial, del SNC y de macrófagos. Dichos vectores y regiones de deficiencia en el crecimiento se enumeran en la Tabla 3:

Tabla 3. Construcción de vectores y caracterización *in vitro*

Nombre del vector	Deficiencia en crecimiento
(Deficiente en tropismo individual)	
CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) y (retanef)	Epitelio
CMVRhΔC/VIS(gag) y (retanef)	SNC
CMVRhΔH/VIS(gag) y (retanef)	Hematopoyético
(Deficiente en tropismo múltiple)	
CMVRhΔEpiCMAXΔC/VIS(gag) y (retanef):	Epitelio/SNC

Nombre del vector	Deficiencia en crecimiento
CMVRhΔCΔH/VIS (gag) y (retanef)	SNC/Hematopoyético
CMVRhΔEpiCMAXΔH/VIS (gag) y (retanef):	Epitelio/Hematopoyético
CMVRhΔEpiCMAXΔCΔH/VIS(gag) y (retanef):	Epitelio/Hematopoyético/SNC

Cada uno de los vectores de CMVRh/VIS deficientes en tropismo múltiples se ensaya *in vitro* con respecto al crecimiento en RF en comparación con cultivos neuronales, epiteliales, endoteliales y de macrófagos como se ha descrito anteriormente.

5

Realizaciones adicionales de la invención se refieren a comparar la dinámica de replicación *in vivo*, persistencia, secreción, inmunogenia y patogenia de vectores de CMVRh/VIS de tropismo modificado con las de vectores de CMVRh/VIS de tipo silvestre.

10 Durante la infección congénita, el SNC es un tejido diana principal que da como resultado pérdida de audición en el niño. En el adulto inmunosuprimido, la infección directa de células epiteliales y endoteliales da como resultado enfermedad del GI, pulmón y retiniana, respectivamente. En todos los casos se cree que las células mieloides son críticas para la diseminación del virus por el hospedador (Sopper, S., Nierwetberg, D., Halbach, A., Sauer, U., Scheller, C., Stahl-Hennig, C., Matz-Rensing, K., Schafer, F., Schneider, T., ter Meulen, V., *et al.* 2003. Impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on lymphocyte numbers and T cell turnover in different organs of rhesus monkeys. Blood 101: 1213-1219). El uso de vectores que son deficientes en su capacidad para replicar en múltiples tipos celulares/tejidos diferentes puede influir en el potencial de CMV para provocar múltiples formas de enfermedad asociada con el virus en todas las poblaciones diana inmunocomprometidas (feto y adulto). Las células epiteliales de la mucosa oral, mama y riñón también son sitios principales de diseminación vírica. Se espera adicionalmente que los vectores defectuosos en tropismo epitelial influyan en la diseminación del virus en la saliva y orina y leche materna. La diseminación reducida es importante para prevenir la propagación ambiental de vectores de vacunados iniciales a contactos no vacunados. Las realizaciones de la invención se refieren a la identificación de un vector modificado óptimo que se selecciona para ensayos de eficacia. El vector seleccionado se elige basándose en su capacidad para inducir y mantener una respuesta inmunitaria desplazada hacia T_{EM} contra su transgén de VIS codificado comparable a vectores de CMVRh de tipo silvestre, mostrando al mismo tiempo replicación reducida en tejidos diana de CMV durante la enfermedad, y diseminación (como se describe posteriormente).

25

Una estrategia de dos estadios para construcción y análisis de vectores de tropismo modificado (como se enumera en la Tabla 3). Vectores de tropismo modificado individual: las realizaciones de la invención se refieren a la construcción de vectores que son individualmente deficientes para la replicación en células epiteliales [CMVRhΔEpiCMAX/VIS(gag) y (retanef)], SNC [CMVRhΔC/SIV(gag) y (retanef)] o células mieloides (hematopoyéticas) CMVRhΔH/VIS(gag) y (retanef)]. Después de la caracterización *in vitro* (véase SA1), los vectores que presentan el fenotipo de tropismo modificado deseado se evalúan con respecto a inmunogenia en MR adultos/juveniles y patogenia/tropismo en el modelo fetal. Cualquier vector con tropismo individual modificado que muestre defectos de crecimiento *in vitro* no anticipados se rechaza y no se caracteriza adicionalmente. De forma similar, la falta de inmunogenia en MR adultos (es decir, la incapacidad para inducir una respuesta de linfocitos T específica de VIS) o tropismo *in vivo* no deseado (basándose en análisis en el modelo fetal) dará como resultado rechazo del vector.

30

35

40 Vectores de múltiples tropismos modificados: Realizaciones adicionales de la invención se refieren a la construcción de vectores con múltiples tropismos modificados basándose en vectores de un único tropismo que muestran tropismo modificado *in vitro* o *in vivo* deseado. Después de determinar vectores con un único tropismo modificado inmunogénicos MR adultos y que muestran el tropismo tisular *in vivo* deseado en el modelo fetal, se analizarán *in vivo* vectores de tropismo múltiple construidos en estos fondos genéticos, que muestran el tropismo *in vitro* multitisular deseado, de una manera comparable a los vectores de un único tropismo. Este grupo de vectores de tropismo múltiple comprende cuatro construcciones que son deficientes para replicación en los siguientes tejidos múltiples: células epiteliales y mieloides [CMVRhΔEpiCMAXΔH/VIS(gag) y (retanef)], células epiteliales y SNC [CMVRhΔEpiCMAXΔC/VIS(gag) y (retanef)], células epiteliales y SNC [CMVRhΔHΔC/VIS(gag) y (retanef)], y los tres tejidos diana [CMVRhΔEpiCMAXΔHΔC/VIS(gag) y (retanef)] (Tabla 3).

45

50

Aspectos de la invención se refieren a la evaluación de la inmunogenia del vector de CMVRh/VIS. El análisis inmunológico inicial se realiza en grupos de 3 MR/vector (FIG. 26). Cada grupo recibe versiones tanto gag como retanef de cada vector como una mezcla en un único inóculo. La vacunación de MR sero+ con vectores de CMVRh/VIS de tipo silvestre da como resultado la inducción de una respuesta de linfocitos T detectable contra el transgén de VIS en el 100 % de los animales a las 3 semanas después de la infección como se ha descrito previamente. Se considerará que cualquier par de vectores (que codifican individualmente gag y retanef) que no consiga inducir una respuesta de linfocitos T detectable contra VISgag o retanef en el momento de refuerzo en la semana 15 habrá "fracasado" en la inmunogenia y no es necesario que se caracterice adicionalmente. Para vectores inmunogénicos, los 3 MR se refuerzan en la semana 15 con el vector de expresión de gag solamente, permitiendo de este modo la caracterización de respuestas tanto "reforzadas" (gag) como no reforzadas (retanef). Al mismo tiempo, se reclutan 3 MR más en la cohorte y se trata de una manera idéntica a los 3 primeros animales, para aportar suficiente potencia estadística para la caracterización inmunológica completa. Todos los MR se siguen

55

60

inmunológicamente y virológicamente durante un total de 45 semanas después de la vacunación inicial (véase FIG. 2 y posteriores).

Se realizan autopsias de todos los MR en la semana 48 para cuantificación sistémica de respuestas de linfocitos T específicas de VIS. Están disponibles un total de 24 MR para ensayo de inmunogenia de vectores de tropismo modificado (además de una cohorte de control de 6 MR a los que se proporcionó CMVRh wt/gag x 2 y CMVRh/retanef x 1). Este número de MR se traduce en varios escenarios de ensayo *in vivo* diferentes potenciales dependiendo del número final de vectores de tropismo modificado que “pasan revisión” y necesitan evaluación completa. Por ejemplo, 5 vectores pueden ensayarse inicialmente en 3 MR cada uno, de los que 3 se seleccionan para ensayo inmunológico completo en 3 MR adicionales (para proporcionar un complemento completo de 6 MR para cada uno de los 3 vectores). Como alternativa, 6 vectores pueden ensayarse inicialmente en 3 MR cada uno, de los que 2 de 6 (los más prometedores con respecto a inmunogenia y/o atenuación) se seleccionan después para ensayo inmunológico completo en 3 MR adicionales (para realizar un complemento completo de 6 MR para cada uno de los 2 vectores).

Se cuantifican respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a las proteínas de VIS (gag y rev/nef/tat), proteínas de control negativo (proteína TB Ag85B) y CMVRh IE (control +) por citometría de flujo de citocinas (CFC) usando mezclas de péptidos de 15 unidades consecutivos, solapantes, que comprenden estas proteínas como se ha descrito previamente en Hansen, S.G., Vieville, C., Whizin, N., Coyne-Johnson, L., Siess, D.C., Drummond, D.D., Legasse, A.W., Axthelm, M.K., Oswald, K., Trubey, C.M., *et al.* 2009. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med* 15: 293-299.

Este ensayo se aplica a PBMC, ganglio linfático (LN) y linfocitos de lavado broncoalveolar [BAL, un sitio efector fácilmente accesible, donde están altamente enriquecidas respuestas inducidas por vector de CMVRh] según el protocolo de animal (FIG. 26) y en la necropsia a preparaciones celulares obtenidas de al menos 6 grupos de LN periféricos diferentes, 3 grupos de LN mesentéricos, BAL, médula ósea, bazo, hígado, mucosa del yeyuno/íleon/colon, mucosa genital y amígdalas/adenoides. La evaluación rutinaria usa combinación de tinción n.º 1 (Tabla 4) en la que las células sensibles se delinean por regulación positiva de CD69 y expresión intracelular de TNF, IFN- γ e IL-2 (solos o en cualquier combinación) y simultáneamente se clasifican en su estado de diferenciación por la expresión de CD28 frente a CCR7 (Picker, L.J., Reed-Inderbitzin, E.F., Hagen, S.I., Edgar, J.B., Hansen, S.G., Legasse, A., Planer, S., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D., Maino, V.C., *et al.* 2006. IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. *J Clin Invest* 116: 1514-1524.). La combinación de tinción n.º 2 se diseña para detectar cambios en el estado de activación y proliferativo de linfocitos T específicos de Ag (definidos por inducción de CD69, TNF e IFN- γ) y se usa para seguir con precisión la respuesta de poblaciones de linfocitos T específicos de VIS establecidas a exposición de Ag *in vivo* después del refuerzo. La combinación de tinción n.º 3 analiza MIP-1 β y desgranulación citotóxica (externalización de CD107) en el contexto de subconjuntos de memoria, y se usa de forma selectiva para extender el análisis funcional de la respuesta en PBMC al menos una vez para cada respuesta antes de la necropsia.

Realizaciones de la invención se refieren al desarrollo de ensayos CFC y además se refieren a la respuesta de linfocitos T específicos de gag y rev/nef/tat que pueden analizarse de forma transcripcional en PBCM y en necropsia en tejidos seleccionados mediante análisis de micromatrices estimuladas por Ag. En este enfoque, se comparan cambios transcripcionales asociados con Ag específico frente a estimulación de control a las 3 y 12 después de la estimulación para proporcionar una evaluación detallada de los programas funcionales de linfocitos T sensibles a Ag.

Tabla 4: Análisis de CFC convencionales para supervisar la inmunogenia del vector de CMVRh/VIS

Ensayos de respuesta específica de Ag: panel de tinción rutinario											
	PB	ACy	FITC	PE	ECD	TrR	PC7	APC	A700	AC7	Comentarios
1	CCR7	CD4	TNF	IL2	CD28*	CD69	CD95	IFN γ	CD3	CD8	TNF, IL2, IFN γ : memoria central/efectora
2	HLA-DR	CD4	KI-67	PD-1	CD25	CD69	TNF	IFN γ	CD3	CD8	TNF, IFN γ : activación <i>in vivo</i>
3	CCR7	CD4	CD107**	MIP-1 β	CD28*	CD69	CD95	TNF	CD3	CD8	TNF, MIP-1 β : desgranulación; memoria cent/efec.

Nota: PB = Pacific Blue, Acy = AmCyan; F = fluoresceína; PE = ficoeritrina; ECD = PE-Texas Red; TR = True Red (PerCP-Cy5.5); APC = alofococianina; A700 = Alexa700; PC7 = PE-Cy7; AC7 = APC-Cy7; los Ag intracelulares están en negrita; conjugado de CD28 proporcionado como co-estimulación junto con mAb CD49 en cultivo de estimulación; conjugados de CD107 también incluidos con células durante la incubación.

El éxito de cada vector modificado con respecto a inmunogenia se valora principalmente por la magnitud de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de VIS totales en PBMC, LN y BAL durante la fase de vacuna (pico y nivel estable) y el tamaño general de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de VIS en tejidos linfoides y sitios efectores en la necropsia. La magnitud de respuesta sistémica general en la necropsia se evalúa determinando la frecuencia promedio de linfocitos T específicos de VIS en cada tejido en la necropsia, y usando datos de recuento de linfocitos T sistémicos previos (Halbach, A., Nierwetberg, D., Muller, J.G., Sauer, U., Kerkau, T., Stolte, N., Hofmann, P., Czub, S., ter Meulen, V., y Sopper, S. 2000. Total numbers of lymphocyte subsets in different lymph node regions of uninfected and SIV-infected macaques. *J Med Primatol* 29:148-157; Sopper, S., Nierwetberg, D., Halbach, A., Sauer, U., Scheller, C., Stahl-Hennig, C., Matz-Rensing, K., Schafer, F., Schneider, T., ter Meulen, V., *et al.* 2003. Impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on lymphocyte numbers and T-cell turnover in different organs of rhesus monkeys. *Blood* 101: 1213-1219.) para calcular los números totales de linfocitos T específicos de VIS en todas las localizaciones de las que se han tomado muestras. Estos datos se analizan estadísticamente usando ensayo de suma de rangos de Wilcoxon. Ya que las respuestas de linfocitos T CD8⁺ inducidas por vector de CMVRh/VIS se correlacionan más estrechamente con la eficacia, se dará preferencia a vectores que induzcan las respuestas mayores en este linaje, particularmente cuando estas poblaciones se localicen en sitios efectores ricos en células diana de VIS. Son criterios secundarios las características funcionales, fenotípicas y transcripcionales de las respuestas de linfocitos T específicas de VIS de estado estacionario en fase crónica, con respuestas de linfocitos T inducidas por vector de CMVRh/VIS modificado que recapitulan más estrechamente respuestas inducidas por vector de CMVRh/VIS de tipo silvestre con respecto a atributos fenotípicos, funcionales y transcripcionales de T_{EM} que tengan prioridad.

Evaluación de la diseminación de vector de CMVRh/VIS: la cuantificación virológica de vectores diseminados a la saliva y la orina determina si los vectores muestran diseminación reducida de estos sitios. Los títulos de vectores de CMVRh en saliva y orina, así como en sangre, se determina por RT-PCR cuantitativa usando cebadores específicos de casete de gag o retanef. Se usan cebadores específicos de CMVRh dirigidos contra CMVRh IE para cuantificar los niveles de CMVRh totales (independientemente del transgén de VIS). Se usa cocultivo de saliva u orina con RF permisivos seguido de análisis de western contra gag o retanef como medida adicional de máxima sensibilidad, pero no cuantitativa de la detección del vector.

Otras realizaciones de la invención se refieren a la evaluación del tropismo tisular/patogenia fetal de CMVRh/VIS: los vectores también se evalúan con respecto a patogenia/tropismo tisular en el modelo fetal. El tropismo celular *in vivo*, así como el nivel de patogenia son parámetros críticos medidos durante el análisis en este modelo. Se sabe que los genes se regulan diferencialmente en el feto en comparación con el adulto (Merkerova, M., Vasikova, A., Belickova, M., y Bruchova, H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev* 19: 17-26). Los fetos se inoculan con cada vector de CMVRh/VIS como se ha descrito previamente. Las secciones tisulares teñidas con HyE/incluidas en parafina/fijadas en formalina para secuelas de CMVRh se evalúan usando metodologías convencionales. Se examinan secciones tisulares con ocultación y se puntúan en una escala de normal a leve a grave. El potencial patógeno de vectores se evalúa usando ultrasonidos y morfometría (Chang, W.L., Tarantal, A.F., Zhou, S.S., Borowsky, A.D., y Barry, P.A. 2002. A recombinant rhesus cytomegalovirus expressing enhanced green fluorescent protein retains the wild-type phenotype and pathogenicity in fetal macaques. *J Virol* 76: 9493-9504).

El análisis de distribución de vectores en diferentes tejidos mediante RT-PCR cuantitativa e inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra marcadores celulares permite la determinación de si los fenotipos de tropismo persisten *in vivo*. Los anticuerpos usados en estos estudios se dirigen contra antígenos de VIS y CMVRh y marcadores celulares de MR tubulina beta-III o marcadores neuronales núcleos neuronales (neuronas inmaduras y maduras), proteína de ácido fibrilar glial (astrocitos), vimentina (fibroblasto), vWF o CD31 (células endoteliales), citoqueratina o zonula occludens-1 (células epiteliales), actina de músculo liso (células de músculo liso), CD68 (macrófago), CD3 (linfocitos T) y CD20 (linfocitos B). Se realiza tinción inmunológica para CMVRh IE1 según protocolos publicados (Abel, K., Strelow, L., Yue, Y., Eberhardt, M.K., Schmidt, K.A., y Barry, P.A. 2008. A heterologous DNA prime/protein boost immunization strategy for rhesus cytomegalovirus. *Vaccine* 26: 6013-6025; Lockridge, K.M., Sequer, G., Zhou, S.S., Yue, Y., Mandell, C.P., y Barry, P.A. 1999. Pathogenesis of experimental rhesus cytomegalovirus infection. *J Virol* 73: 9576-9583; Bissel, S.J., Wang, G., Ghosh, M., Reinhart, T.A., Capuano, S., 3^o, Stefano Cole, K., Murphey-Corb, M., Piatak Jr, M., Jr., Lifson, J.D., y Wiley, C.A. 2002. Macrophages Relate Presynaptic and Postsynaptic Damage in Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *Am J Pathol* 160: 927-941; Sequer, G., Britt, W.J., Lakeman, F.D., Lockridge, K.M., Tarara, R.P., Canfield, D.R., Zhou, S.S., Gardner, M.B., y Barry, P.A. 2002. Experimental coinfection of rhesus macaques with rhesus cytomegalovirus and simian immunodeficiency virus: pathogenesis. *J Virol* 76: 7661-7671).

Las secciones tisulares se puntúan con respecto a tinción de IE1 en una escala flexible de ninguna a mínima (células individuales aisladas) a grave (áreas de tinción focales extensivas). Los protocolos de tinción se realizan de acuerdo con protocolos publicados y no publicados como se describe en Batchelder, C.A., Lee, C.C., Matsell, D.G., Yoder, M.C., y Tarantal, A.F. 2009. Renal ontogeny in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and directed differentiation of human embryonic stem cells towards kidney precursors. *Differentiation* 78:45-56; Abenes, G., Lee, M., Haghighi, E., Tong, T., Zhan, X., and Liu, F. 2001. Murine cytomegalovirus open reading frame M27 plays an important role in growth and virulence in mice. *J Virol* 75:1697-1707; Carlson, J.R., Chang, W.L., Zhou, S.S.,

Tarantal, A.F., y Barry, P.A. 2005. Rhesus brain microvascular endothelial cells are permissive for rhesus cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 86:545-549; Mazumdar, K., Alvarez, X., Borda, J.T., Dufour, J., Martin, E., Bethune, M.T., Khosla, C., and Sestak, K. Visualization of transepithelial passage of the immunogenic 33-residue peptide from alpha-2 gliadin in gluten-sensitive macaques. *PLoS One* 5:e10228; Orzechowska, B.U., Manoharan, M., Sprague, J., Estep, R.D., Axthelm, M.K., y Wong, S.W. 2009. Viral interleukin-6 encoded by rhesus macaque rhadinovirus is associated with lymphoproliferative disorder (LPD). *J Med Primatol* 38 Supl 1:2-7). Todos los anticuerpos se dirigen a antígenos humanos pero tienen reactividad cruzada demostrada con el ortólogo de MR.

Las realizaciones de la invención se refieren a la evaluación de Eficacia frente a Exposición a VIS. Basándose en todas las características de tropismo/patógenas inmunológicas, virológicas y fetales, los vectores más prometedores se seleccionan para su uso en ensayos de eficacia en un modelo de exposición a VISmac239 interrectal de baja dosis. Para estos ensayos de eficacia, las construcciones de VIS restantes para un diseño de vector seleccionado (es decir, que expresa, pol I y II) se construyen de modo que tengan un conjunto de vectores completo para evaluación de la eficacia. Los criterios para selección de vectores para evaluación en ensayos de eficacia y en modelo de inmunosupresión de adultos se basan principalmente en los niveles de linfocitos T_{EM} CD8⁺ específicos de VIS en sitios de tejido mucoso efectores, así como inmunogenia sistémica, perfil de tropismo tisular/patogenia fetal y diseminación. Inmunológicamente, un vector óptimo induce y mantiene niveles comparables o mayores de respuestas desplazadas hacia T_{EM} en tejidos efectores contra los insertos de VIS. Viroológicamente, el vector óptimo tiene un nivel mínimo de patogenia en el modelo de patogenia fetal, y muestra una diseminación reducida a saliva y orina.

Las realizaciones de la invención se refieren a ensayos de patogenia en el modelo de inmunosupresión de adultos: se analizan versiones que expresan Gag de vectores seleccionados para ensayos de eficacia con respecto a patogenia en el modelo de supresión inmunitaria de adultos. Este modelo usa supresión inmunitaria yatrógena de animales seronegativos adultos que se someten a infección por CMVRh primaria a través de la vía IV. Resulta importante que este modelo permite la caracterización de potencial patógeno completo de vectores de CMVRh en la población diana anticipada primaria (es decir, adultos humanos jóvenes). Todos los MR pasan a necropsia para evaluación de la patología del vector y el tropismo tisular, como se ha descrito anteriormente para el modelo fetal. Estos datos extienden la evaluación de la seguridad del vector que proporciona criterios adicionales para selección de diseños de vector de CMV para traslación a seres humanos.

Las realizaciones de la invención se refieren a la generación y caracterización de vectores de CMVH/VIH correspondientes a vectores de CMVRh/VIS de tropismo modificado. Los vectores de CMVH/VIH se construyen basándose en los vectores de tropismo deficiente de CMVRh/VIS que demuestran la mayor atenuación sin pérdida de inmunogenia de VIS en MR descritos anteriormente. Se construyen versiones de CMVH que contienen las mismas modificaciones genéticas que los vectores de CMVRh seleccionados que muestran un fenotipo comparable *in vitro*. Este aspecto de la invención se refiere a la construcción del vector de CMVH/VIH en lugar de la construcción de una vacuna de CMVH/VIH que sería adecuada para su uso en estudios clínicos. Aunque la mayoría de los genes de CMVRh son funcionalmente equivalentes, CMVH tiene algunos genes de tropismo epitelial que parecen ser diferentes de CMVRh (Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stole, V., Zhu, H., y Liu, F. 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14223-14228).

Aunque los genes con tropismo a células epiteliales de CMVRh, rhUL128-131, Rh01, Rh159, Rh160 y Rh203 tienen homólogos en CMVH (UL128-131A, TRL, UL148, UL132 y US 22, respectivamente), solamente UL128-131A se ha identificado como una gen con tropismo a células epiteliales en CMVH. El locus UL128-131A de CMVH no se suprime ya que la supresión de estos genes también elimina la infección de células endoteliales y macrófagos. Sin embargo, la mutagénesis dirigida de CMVH ha revelado que la mutación de UL64 y US29 redujo significativamente el crecimiento de CMVH en células epiteliales pero no endoteliales o de fibroblastos humanos (HF) como se ha descrito previamente. Por tanto en la generación del virus deficiente en tropismo epitelial estos genes son ideales para dirigirse a supresión en la generación de una vacuna de CMVH deficiente en tropismo a células epiteliales. La traslación del CMVRh deficiente en tropismo a macrófagos y SNC a CMVH es más sencilla ya que los genes seleccionados para dirección de miARN son genes esenciales en ambos virus. Se ensayan vectores deficientes en tropismo de CMVH con respecto a su capacidad para replicar en cultivos epiteliales, neuronales, endoteliales y en macrófagos *in vitro* para asegurar el defecto del tropismo. Resulta importante que estos estudios proporcionan los "planos" de construcción para el vector CMVH/VIH final para usar para estudios clínicos.

Se diseñan vectores de vacuna deficientes en tropismo de CMVH/VIH basándose en las propiedades de atenuación e inmunogenia óptimas. Pueden generarse 3-4 vectores de vacuna de CMVH/VIH que tienen combinaciones de propiedades de tropismo alteradas. Las vacunas de CMVH/VIH se construyen usando la cepa de CMVH TR como la base genética (Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M.A., Hahn, G., Nelson, J.A., Myers, R.M., y Shenk, T.E. 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14976-14981). Esta cepa de CMVH es un aislado clínico clonado como un BAC infeccioso que mantiene tropismo diverso para múltiples tipos celulares.

Para virus CMVH deficientes en tropismo epitelial las primeras dianas son genes que se sabe que son necesarios para el crecimiento en estos tipos celulares, incluyendo el UL64 y US29 (véase anteriormente). Se generan

mutantes de supresión individuales y dobles de UL64 y US29 usando tecnología BAC. Se determina si los mutantes de CMVH UL64/US29 sencillos o dobles muestran crecimiento restringido en células epiteliales (células epiteliales retinianas humanas y células Caco 2) pero no células endoteliales o HF. La estrategia de inactivación de miARN para inactivación de genes esenciales en SNC y macrófagos se construye usando el enfoque descrito anteriormente con CMVRh. Se incorpora una combinación de los fenotipos deficientes en tropismo en uno o dos vectores con los vectores con múltiples tropismos modificados de CMVRh/VIS. Para determinar si los vectores de CMVH/VIH muestran los defectos de tropismo predichos a partir de los estudios de CMVRh/VIS, se determinan las propiedades de crecimiento de estos virus en una diversidad de tipos celulares diferentes incluyendo HF, células epiteliales y endoteliales, cultivos neuronales primarios y macrófagos. Los tipos celulares incluyendo múltiples células endoteliales micro y macrovasculares, células epiteliales (células epiteliales retinianas, células Caco 2), células neuronales (células SY5Y y SKMN), y macrófagos primarios generados a partir de células mononucleares de sangre periférica (57) que son capaces de mantener la replicación de CMVH están disponibles para los solicitantes. Se realizan curvas de crecimiento de una etapa y multietapa con estas células para comparar la eficacia de replicación de los vectores deficientes en tropismo de CMVH/VIH en comparación con virus de tipo silvestre.

Ejemplo 6:

Desarrollo de una nueva vacuna de la polio oral de una única dosis, no reversible, para reemplazar la VPO. Este ejemplo describe el uso de la plataforma de vacuna basada en citomegalovirus (CMV) altamente inmunogénica para desarrollar una vacuna de la polio que induzca la inmunidad protectora contra los 3 serotipos de poliovirus, pero no tenga capacidad de "revertir" a una forma patógena del poliovirus.

Antecedentes: la vacunación con la vacuna de la polio inactivada (VPI) "muerta" o vacuna de la polio oral atenuada "viva" (VPO) ha dado como resultado una reducción drástica de la incidencia de parálisis paralítica flácida asociada con la polio en todo el mundo. Debido a varias características (tales como bajo coste de producción, administración oral e inducción de inmunidad de la mucosa) la VPO se ha seleccionado sobre la VPI para la Iniciativa de la Erradicación de la Polio Global (GPEI) en 1988. Desde el inicio del programa de GPEI, la vacunación de VPO ha dado como resultado una reducción drástica de la parálisis asociada a la polio de >350.000 casos en 125 países a <100 en 4 países endémicos (hasta marzo de 2011). Siendo la erradicación global del poliovirus de tipo silvestre inminente, seguido de la detención planeada de la vacunación, la "reversión" de VPO a formas paralíticas de poliovirus se convierte en el último obstáculo restante. La reversión de VPO resulta de mutación genética de VPO "vivo" en circulación residual en una forma paralítica del virus, y es la única razón de la necesidad de una estrategia de "finalización".

La capacidad de la reversión de VPO para provocar brotes de enfermedad es un problema "del mundo real", que ya se está produciendo en países en desarrollo con escasa cobertura de vacuna. La implementación de vacunación de VPI "muerta" se ha propuesto como una posible estrategia de finalización para abordar la reversión de VPO, manteniéndose la vacunación de VPI hasta que la VPO ya no esté en circulación dentro de la población humana. Aunque esta estrategia puede ser potencialmente eficaz, el coste de vacunación de VPI (que tiene un alto coste de producción, y requiere una aguja y personal médico entrenado para su administración) hace a este enfoque prohibitivamente caro para su uso en naciones más pobres. Las realizaciones de la invención se refieren a una estrategia de finalización alternativa usando una vacuna de la polio basada en CMV que tiene todos los atributos positivos de la VPO, pero sin ninguna posibilidad de reversión ya que no se basa en un fondo genético de poliovirus.

La VPO se eligió para erradicación de poliovirus global debido a su conveniencia para su uso en todas las naciones, tanto ricas como pobres. El CMV potencialmente comparte todas las características que hacen a la VPO la vacuna elegida para erradicación del poliovirus global, pero sin el inconveniente de reversión de VPO: 1) la capacidad para administración oral por individuos no entrenados médicamente, 2) fabricación económica sin etapas de inactivación química costosas y control de calidad asociado con VPI, y 3) alta inmunogenia, induciendo inmunidad de la mucosa (celular y de anticuerpo) que puede bloquear la replicación de poliovirus en el intestino. El CMV posee varias cualidades beneficiosas adicionales para su uso como vacuna de la polio. El CMV puede reinfectar individuos sanos independientemente de la seropositividad a la CMV.

Esta capacidad para reinfectar independientemente de inmunidad del vector de vacuna preexistente es una ventaja decisiva sobre otras vacunas, incluyendo VPO, donde la inmunidad contra el vector o reactividad cruzada con patógenos presentes en el ambiente (es decir, enterovirus para VPO), limita gravemente la "toma" de la vacuna. El CMV también es benigno en individuos sanos, y la inmunogenia no requiere replicación de CMV. Sin embargo, el CMV sí provoca enfermedades en individuos inmunosuprimidos, tales como pacientes de trasplante y neonatos. En estas poblaciones inmunosuprimidas, la replicación de CMV es un requisito absoluto para la patogenia: si no hay replicación no hay enfermedad. La disociación de inmunidad de CMV de replicación de CMV es un hallazgo crítico, ya que sugiere que una vacuna de la polio basada en CMV defectuosa en replicación será inmunogénica y segura en todas las poblaciones humanas, independientemente del estado inmunitario. Finalmente, las vacunas de CMV funcionan. Estudios recientes en macacos rhesus (MR) muestran que CMV de rhesus (CMVRh) que expresan antígenos de inmunodeficiencia de simios (VIS) inducen protección contra infección por VIS. Esta es la primera vacuna contra VIS o VIH que se ha mostrado que induce protección contra la infección. Además, la protección contra VIS tuvo una larga duración (observada >486 días después de la vacunación).

Las realizaciones de la invención se refieren a evaluar la capacidad de una vacuna de la polio basada en CMVM que expresa un antígeno diana protector del poliovirus de tipo 1 para inducir inmunidad protectora contra poliovirus en ratones. Se construye un CMVM recombinante que expresa de forma estable proteína vírica 1 (VP1) de longitud completa del poliovirus de tipo 1 (CMVM/VP1PV1) (Figura 27). Después de la caracterización inmunológica de CMVM/VP1PV1, se determinará la eficacia protectora de CMVM/VP1PV1 contra poliovirus de tipo 1 en el modelo de exposición de ratón transgénico (Tg) del receptor de poliovirus de ratón (PVR). Una vacuna de la polio basada en CMVM se usa solamente como "prueba de concepto" para el desarrollo de una vacuna de poliovirus basada en CMV humana para su uso en seres humanos.

La Figura 27 muestra que VP1 en CMVM/VP1_{PV1} está marcado con epítipo (V5) para facilitar su detección. CMVM/VP1_{PV1} se pasó en serie múltiples veces en fibroblastos de embrión murino (MEF). Las células se recogen en el momento de máximo efecto citopático (CPE) para análisis de la expresión de VP1 basándose en la reactividad anti-V5. Se indican números de pase en serie encima de la imagen del gel.

Otras realizaciones de la invención se refieren a la evaluación de la capacidad de una versión defectuosa en diseminación de CMVM/VP1PV1 para inducir inmunidad protectora contra poliovirus de tipo 1 en el modelo de Tg de PVR. Una versión defectuosa en diseminación de CMVM/VP1PV1 (por ejemplo, CMVMΔgL/VP1PV1) se reparará por supresión de un gen de CMVM esencial (glucoproteína L, gL) por recombinación de cromosoma artificial bacteriano (BAC) convencional. Se ha mostrado que esta estrategia, seguida de complementación en una línea celular que expresa gL, es una técnica sencilla para preparar virus de CMV defectuosos en diseminación (Snyder, C. M., J. E. Allan, E. L. Bonnett, C. M. Doom, y A. B. Hill. 2010. Cross-presentation of a spread-defective CMVM is sufficient to prime the majority of virus-specific CD8⁺ T cells. *PLoS One* 5:e9681.) (Bowman, J. J., J. C. Lacayo, P. Burbelo, E. R. Fischer, y J. I. Cohen. 2011. Rhesus and human cytomegalovirus glycoprotein L are required for infection and cell-to-cell spread of virus but cannot complement each other. *J Virol* 85:2089-99). La inmunogenia y eficacia protectora de CMVMΔgL/VP1PV1 contra exposición a poliovirus de tipo 1 se determinan como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de CMV pueden expresar una diversidad de antígenos diana diferentes lo que sugiere que los vectores de CMV/VP1PV1 inducirán respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 específicos de VP1 de alta duración y sustanciales. La capacidad de VPO, pero no VPI, para prevenir el establecimiento de infección por poliovirus en el intestino subraya la importancia de la inmunidad celular para el control de poliovirus. Los vectores de CMV/VP1PV1 pueden inducir niveles duraderos de anticuerpos específicos de VP1 y estos vectores se ensayan adicionalmente para determinar si estos anticuerpos son neutralizantes. Los péptidos tanto proteicos como sintéticos de VP1 son capaces de inducir niveles biológicamente significativos de anticuerpos neutralizantes (aunque a niveles menores que los inducidos por virus intacto). La respuesta de anticuerpos inducida por vectores de CMV/VP1PV1 puede ser neutralizante, pero quizás hasta un nivel menor que el observado con vacunación por VPO o VPI. Ya que se espera que los vectores de CMV/VP1PV1 induzcan altos niveles de linfocitos T (sistémicos así como en la mucosa) y un nivel biológicamente significativo de anticuerpos neutralizantes específicos de VP1, tanto CMV/VP1PV1 como CMVΔgL/VP1PV1 pueden proteger contra exposición a poliovirus de tipo 1.

Las realizaciones de la invención se refieren al establecimiento de que un vector basado en CMV defectuoso en diseminación, seguro, puede inducir inmunidad protectora contra poliovirus de tipo 1, determinar si el vector basado en CMV replicante (CMVM/VP1PV1) es inmunogénico y eficaz contra exposición a poliovirus de tipo 1 y usar CMVMΔgL/VP1PV1 para establecer que no se requiere diseminación para inmunogenia o eficacia de una vacuna de la polio basada en CMV. Realizaciones adicionales se refieren a demostrar que un vector basado en CMV defectuoso en diseminación induce inmunidad protectora contra poliovirus de tipo 1, estableciendo de este modo que no se requiere diseminación de CMV para eficacia de la vacuna. Este hallazgo facilita el desarrollo de una vacuna de la polio basada en CMV segura para su uso en todas las poblaciones diana humanas potenciales en todo el mundo. Los modelos de poliovirus de primates no humanos fueron cruciales durante el desarrollo de VPO y VPI, y serán críticos para mover la vacuna de la polio basada en CMV hacia ensayos humanos. Las realizaciones adicionales también se refieren a determinar la inmunogenia y eficacia protectora de CMVRhΔgL/VP1PV1 defectuoso en diseminación en MR y determinar si vectores de CMVRhΔgL/VP1 monovalentes que expresan cada uno un gen de VP1 de uno de los tres serotipos de poliovirus, o un único CMVRhΔgL/VP1 multivalente que expresa los 3 serotipos pueden inducir juntos protección contra los 3 serotipos de poliovirus. La construcción de una versión de CMVRhΔgL/VP1 humana de vacuna trivalente más eficaz para ensayos en Fase I humanos también está abarcada en la presente invención.

Ejemplo de Referencia 7: Una vacuna basada en Citomegalovirus que Codifica un único Virus del Ébola

El Epítipo de Nucleoproteína de CTL Confiere Protección contra el Virus del Ébola. Este ejemplo demuestra la capacidad de un enfoque de vacuna basada en CMV para proteger contra un patógeno humano altamente virulento.

Sumario: En el presente ejemplo los Solicitantes han construido un vector de EBOV basado en CMVM que expresa un único epítipo de CTL de NP de ebolavirus Zaire ZEBOV (CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}). Se ha mostrado que CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} es altamente inmunogénico, induciendo respuestas de CTL CD8⁺ multifuncionales, duraderas, contra NP de ZEBOV en múltiples cepas de ratones. Es importante que CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} confiere protección

contra exposición a ZEBOV letal hasta un nivel comparable a una vacuna de EBOV “de referencia” convencional. La ausencia de anticuerpos neutralizantes en animales protegidos identificó que la protección estaba mediada por linfocitos T.

5 *Antecedentes:* Los brotes humanos de enfermedad hemorrágica Provocada por el virus del Ébola (EBOV) son una preocupación de salud humana grave. El EBOV, un miembro de la familia *Filoviridae*, provoca fiebre hemorrágica vírica de rápida progresión que culmina en fallo multiorgánico, choque y muerte [Feldmann H, Geisbert TW (2010) Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*]. El EBOV puede subdividirse en cuatro especies definidas y una quinta especie potencial [Feldmann H, Geisbert TW, Jahrling PB, al. e (2004) En: Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editores. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Londres: Elsevier/Academic Press. pp. 645-653, Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albarino CG, Conlan S, *et al.* (2008) Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* 4: e1000212]. Las especies de EBOV difieren en su nivel de virulencia, siendo el ebolavirus Zaire (ZEBOV) el más virulento (80-90 % de mortalidad) [Sanchez A, Geisbert TW, Feldmann H (2006) *Filoviridae*: Marburg and Ebola Viruses. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 5ª ed. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins. pp. 1409-1448]. La creciente frecuencia de brotes en áreas endémicas de África, combinado con el potencial de introducción accidental y deliberada en naciones no endémicas hace al EBOV un problema de salud global creciente. El potencial para la rápida diseminación a países no endémicos se demostró en 2008 por la importación del virus Marburg (un filovirus estrechamente relacionado con el EBOV) a los Estados Unidos [WHO (2009) Case of Marburg Haemorrhagic Fever imported into the United States] y los Países Bajos [WHO (2008) Case of Marburg Haemorrhagic Fever imported into the Netherlands from Uganda] por turistas infectados en Uganda.

Se han desarrollado varias vacunas de EBOV candidatas que son protectoras contra la infección en modelos animales [Falzarano D, Geisbert TW, Feldmann H (2011) Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use. *Expert review of vaccines* 10: 63-77, Geisbert TW, Bausch DG, Feldmann H (2010) Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Reviews in medical virology* 20: 344-357]. Los adenovirus defectuosos en replicación que expresan glucoproteína de EBOV (GP) solamente [Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Shedlock DJ, Xu L, *et al.* (2006) Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med* 3: e177] o en combinación con nucleoproteína (NP) [Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Xu L, Yang ZY, *et al.* (2003) Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* 424: 681-684], partículas de tipo vírico comprendidas por proteína de la matriz del virus (VP40) y GP con o sin NP [Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Kalina WV, Aman MJ, *et al.* (2007) Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *The Journal of infectious diseases* 196 Supl 2: S430-437, Swenson DL, Warfield KL, Negley DL, Schmaljohn A, Aman MJ, *et al.* (2005) Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* 23: 3033-3042], y virus de la estomatitis vesicular (VSV) competente en replicación que expresa GP [Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, *et al.* (2005) Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11: 786-790, Geisbert TW, Geisbert JB, Leung A, Daddario-DiCaprio KM, Hensley LE, *et al.* (2009) Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of Ebola virus. *J Virol* 83: 7296-7304] son todos capaces de inducir de forma uniforme inmunidad protectora en modelos de animales pequeños y primates no humanos (PNH). Se ha demostrado que la inmunización oral con la vacuna basada en VSV induce protección en ratones [Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, *et al.* (2007) Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 196 Supl 2: S404-412], lo que conduce a la sugerencia de su uso para cebado en alimentos [Groseth A, Feldmann H, Strong JE (2007) The ecology of Ebola virus. *Trends Microbiol* 15: 408-416, Dolgin E (2008) Baiting Ebola. *The Scientist* 22: 22].

Una vacuna basada en citomegalovirus (CMV) ofrece un enfoque alternativo. El CMV es uno de los virus más inmunogénicos conocidos [Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelté C, *et al.* (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202: 673-685], induciendo una respuesta inmunitaria característica que está altamente enriquecida para linfocitos T “efectores” (T_{EM}) [Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, *et al.* (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature medicine* 15: 293-299]. Estas células se localizan predominantemente en sitios de mucosa extra-linfoides, y se sensibilizan funcionalmente para función efectora antipatógena inmediata [Kaech SM, Wherry EJ (2007) Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* 27: 393-405]. Una vacuna basada en CMV puede estar relacionada con la prevención de infección sistémica de macacos rhesus por virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), un modelo de PNH para VIH, que es la primera vacuna en evitar la adquisición de VIS completamente patógeno [Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, *et al.* (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature medicine* 15: 293-299].

Para evaluar el potencial de CMV para su desarrollo como una vacuna contra EBOV, los Solicitantes han diseñado una vacuna de EBOV basada en citomegalovirus murino (CMVM) (CMVM/ZEBOV-NP_{ctII}) que expresa un epítipo de CTL CD8+ de NP de ZEBOV (43-VYQVNNLEEIC-53; NP₄₃) [Wilson JA, Hart MK (2001) Protection from Ebola virus

mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. J Virol 75: 2660-2664, Olinger GG, Bailey MA, Dye JM, Bakken R, Kuehne A, *et al.* (2005) Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. J Virol 79: 14189-14196, Simmons G, Lee A, Rennekamp AJ, Fan X, Bates P, *et al.* (2004) Identification of murine T-cell epitopes in Ebola virus nucleoprotein. Virology 318: 224-230] fusionado con una proteína de CMVM no esencial, IE2 (FIG. 1a). Se construyó CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} mediante recombinación E/T usando un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que contiene el genoma de CMVM (pSM3fr) [Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, *et al.* (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. Nature medicine 15: 293-299, Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M (1999) Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. J Virol 73: 7056-7060]. Se seleccionaron clones de pCMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (5A1 y 5D1) independientes para caracterización. La digestión con enzimas de restricción seguida de electroforesis no mostró ninguna reordenación genómica general en comparación con BAC parental de tipo silvestre (WT) (FIG. 32). Los virus se reconstituyeron mediante transfección de ADN de BAC en fibroblastos embrionarios murinos (MEF). El análisis de crecimiento *in vitro* de virus reconstituidos mostró cinética de replicación comparable a CMVM WT (FIG. 33).

Para evaluar el nivel de respuestas de CTL CD8⁺ específicas de NP inducidas por CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}, los Solicitantes realizaron estudios de inmunogenia en ratones 129S1/SvImJ/Cr restringidos a H2^b. Se inmunizaron ratones (n=5/grupo) por vía intraperitoneal (i.p.) con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (clon 5A1 o 5D1), CMVM/PSA (clon 3-1) (un CMVM de control que expresa un epítipo restringido a H2^b irrelevante de antígeno específico de próstata humana, PSA [Pavlenko M, Leder C, Roos AK, Levitsky V, Pisa P (2005) Identification of an immunodominant H-2D(b)-restricted CTL epitope of human PSA. Prostate 64:50-59]), a CMVM WT o diluyente (Simulación). Después de un "refuerzo" usando un inóculo idéntico en la semana 4, se recogieron esplenocitos en la semana 8 para análisis de respuestas de linfocitos T (FIG. 28B). Se analizaron linfocitos T específicos de antígeno mediante tinción de citocinas intracelular (TCI) después de una incubación de 6 horas *in vitro* con péptidos que representan diferentes epítopos restringidos a H2^b. Todos los ratones vacunados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} mostraron respuestas de CTL CD8⁺ significativas contra NP de ZEBOV (FIG. 28B). El nivel de respuestas de NP inducidas por 5A1 y 5D1 no fueron significativamente diferentes, y se consideraron en su conjunto como un único conjunto de datos. Las respuestas de linfocitos T específicas de NP de ZEBOV inducidas fueron sustanciales (media=2,83 % de linfocitos T CD8⁺ totales; intervalo=0,32 a 5,99 %), CD8⁺ (sin respuesta en el compartimento de células CD4⁺), y específicas (dirigidas contra NP de ZEBOV, pero sin control de PSA). Los CTL CD8⁺ inducidos contra NP de ZEBOV fueron polifuncionales, expresando tanto IFN γ como TNF α (FIG. 28C). Todos los ratones excepto controles vacunados con simulación tuvieron CTL CD8⁺ dirigidos contra la proteína M45 codificada por CMVM.

Una característica única de respuestas inmunitarias inducidas por CMV es su "inflación" a lo largo del tiempo con maduración a memorias de linfocitos T "efectora" estable (T_{EM}) que persiste durante toda la vida [Klenerman P, Dunbar PR (2008) CMV and the art of memory maintenance. Immunity 29: 520-522]. En comparación con la memoria de linfocitos T (T_{CM}) central clásica inducida por vectores agudos o no replicantes tales como virus vaccinia adenovirus, T_{EM} se localizan en sitios efectores epiteliales mucosos, y tienen función efectora inmediata [Cheroutre H, Madakamutil L (2005) Mucosal effector memory T cells: the other side of the coin. Cell Mol Life Sci 62: 2853-2866, Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401: 708-712]. Para determinar la durabilidad de respuestas de linfocitos T específicas de NP de ZEBOV a partir de una única inoculación de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}, los ratones (n=14) se vacunaron (i.p.) con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}, y las respuestas de linfocitos T periféricas se siguieron longitudinalmente. Gradualmente se acumularon respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de NP hasta altos niveles y persistieron (aumentando del 0,79 % en la semana 8, al 3,08 % a las 33 semanas después de la inoculación individual) (FIG. 29). Aunque es retardada, la respuesta de CTL específica de NP fue comparable en su cinética de inducción y magnitud a la respuesta "inflacionaria" desplazada hacia T_{EM} dirigida contra CMVM M38 [Munks MW, Cho KS, Pinto AK, Sierro S, Klenerman P, *et al.* (2006) Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. J Immunol 177: 450-458, Karrer U, Sierro S, Wagner M, Oxenius A, Hengel H, *et al.* (2003) Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8⁺ T cells over time. J Immunol 170: 2022-2029]. Es importante que estos resultados muestran que una vacuna de EBOV basada en CMV puede inducir altos niveles de linfocitos T CD8⁺ contra un antígeno de EBOV que aumenta con el tiempo y son duraderos.

Para determinar si CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} era capaz de inducir inmunidad protectora contra exposición a ZEBOV letal, los solicitantes realizaron estudios de exposición en ratones C57BL/6 usando ZEBOV adaptado a ratón (ma-ZEBOV) como el virus de exposición [Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, *et al.* (2007) Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. J Infect Dis 196 Supl 2: S404-412, Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C, Huggins J (1998) A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. J Infect Dis 178: 651-661]. El ma-ZEBOV es uniformemente letal en ratones no vacunados, que sucumben 5-7 días después de la exposición [Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, *et al.* (2007) Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. J Infect Dis 196 Supl 2: S404-412, Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C, Huggins J (1998) A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. J Infect Dis 178: 651-661]. Se inmunizaron cuatro grupos de ratones (n=20/grupo) con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} 5A1 o 5D1, CMVM

WT o diluyente, y se reforzaron en la semana 4 (FIG. 30). En la semana 8, se analizaron esplenocitos de 6 ratones/grupo con respecto a respuestas de linfocitos T. 5A1 y 5D1 indujeron respuestas comparables contra NP, lo que permitió considerar los ratones que recibían cualquiera de los clones como un único conjunto de datos. CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} indujo niveles considerables de linfocitos T CD8⁺ contra NP de ZEBOV (media = 1,34 % de los linfocitos T CD8⁺ totales; intervalo = 0,05 a 2,68 %). Estos resultados también muestran que la capacidad de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} para inducir linfocitos T específicos de NP es independiente de la cepa de ratón (FIG. 28C y FIG. 30). Todos los ratones excepto los controles vacunados con simulación tuvieron CTL CD8⁺ dirigidos contra M38 y M45 codificados por CMVM.

En la semana 10, los ratones restantes (n= 14/grupo) se expusieron i.p. a 10³ de DL₅₀ de ma-ZEBOV. Un grupo adicional (n= 14) que había recibido VSVΔG/ZEBOVGP (5x10⁵ ufp; i.p.), que confiere altos niveles de protección contra ma-ZEBOV, se incluyó como un control para protección por vacuna [Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, *et al.* (2007) Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 196 Supl 2: S404-412.]. Después se supervisó la enfermedad de ZEBOV basándose en la supervivencia, morbilidad basada en las señales clínicas (pelo erizado, postura encorvada, parálisis y pérdida de peso) y viremia. Los controles vacunados con simulación y CMVM/WT mostraron enfermedad de ZEBOV normal, con morbilidad significativa (FIG. 31B); sucumbieron a la infección en el periodo de tiempo normal (modo = 7 días) después de la exposición (FIG. 31A). Por el contrario, los ratones vacunados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} no mostraron ninguna prueba de enfermedad de ZEBOV, con 100 % de supervivencia y sin señales de morbilidad (FIGS. 31A-B). Como un análisis cuantitativo de la eficacia de vacuna, se midió la viremia el día 4 después de la exposición (pico de la viremia de ZEBOV en ratones) en un subconjunto de ratones (n=3-4/grupo) recogidos en este momento (FIG. 31C). La vacunación con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} dio como resultado un nivel de control profundo, con la viremia reducida a niveles observados para los controles de VSVΔG/ZEBOVGP. Específicamente, 5 de 8 ratones mostraron un control completo de viremia de ZEBOV hasta niveles indetectables (inmunidad de esterilización). Los 3 ratones restantes mostraron una reducción de 2,5 log en viremia en comparación con controles vacunados con CMVM WT. La vacunación con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} no induce anticuerpos neutralizantes de ZEBOV, como se esperaría a partir de la expresión de un único epítipo de CTL de 11 unidades de NP. Sin embargo, bajos niveles de replicación de ma-ZEBOV después de la exposición podrían de forma factible haber inducido anticuerpos neutralizantes que influirían positivamente en la resolución de la enfermedad. Para determinar si la protección resultó completamente del control mediado por linfocitos T, los Solicitantes midieron la actividad neutralizante de ma-ZEBOV en sueros de un subconjunto seleccionado aleatoriamente (n=6) de ratones CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} protegidos a los 28 días después de la exposición. Los ratones de control VSVΔG/ZEBOVGP tuvieron niveles bajos, pero detectables, de actividad neutralizante después de exposición [Jones SM, Stroher U, Fernando L, Qiu X, Alimonti J, *et al.* (2007) Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 196 Supl 2: S404-412]. Por el contrario, no se detectó actividad neutralizante en ningún suero convaleciente de ratones vacunados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} lo que demuestra que la protección estaba mediada solamente por linfocitos T CD8⁺ (FIG. 33).

Conclusiones: los Solicitantes demuestran que una vacuna basada en CMV puede proporcionar protección contra ZEBOV, el primer estudio que muestra que una vacuna basada en CMV puede proteger contra alguna enfermedad humana. El nivel de protección fue profundo, con un control de ZEBOV comparable al conseguido por una de las vacunas "de referencia", VSVΔG/ZEBOVGP. Este nivel de control de ZEBOV, conseguido usando un vector de CMV que expresa solamente un epítipo de CTL, subraya el potencial de esta plataforma de vacuna.

La FIG. 28 representa respuestas de linfocitos T después de inmunización con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. (a) Representación esquemática de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. Se fusionó un epítipo de linfocitos T restringido a H2^b de NP de ZEBOV (VYQVNNLEEIC) "en fase" con el extremo carboxilo terminal de IE2 de CMVM (M122) generando el CMVM recombinante, CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. IE2 de CMVM es una proteína no esencial, (b) se inmunizaron ratones 129S1/SvImJ/Cr (restringidos a H2^b) (n=5/grupo) por vía intraperitoneal (i.p.) usando 5x10⁵ ufp de lo siguiente: uno de dos clones independientes de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (5A1 y 5D1), CMVM/PSA (clon 3-1) (un vector de CMVM comparable que expresa IE2 fusionado con un epítipo restringido a H2^b de antígeno específico de próstata humano, PSA), CMVM WT o diluyente (control de simulación). Los ratones se reforzaron en la semana 4, y se recogieron esplenocitos para análisis de respuestas de linfocitos T la semana 8. Se analizaron linfocitos T usando tinción de citocina intracelular (TCI) con una incubación de 6 horas en presencia de brefeldina A (BFA) con péptido (o MAb anti-CD3, para respuesta de linfocitos T total). Se muestran los niveles de células CD8⁺ (parte superior) y CD4⁺ (parte inferior) con respuesta (dobles positivos para IFN-γ y TNFα) en ratones individuales. Todos los ratones inmunizados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (n=10) mostraron respuestas de linfocitos T restringidas a CD8 significativas contra el antígeno diana de NP. (c) Respuestas típicas de ratones vacunados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. La mayoría de linfocitos T que responden a NP de ZEBOV son polifuncionales (que expresan tanto IFN-γ como TNFα) y son específicos para el epítipo de NP (no observado después de incubación con el péptido de PSA o controles no estimulados). De forma coherente con la infección de CMVM, todos los ratones demuestran respuestas de linfocitos T a M45 de CMVM. Se sabe que las respuestas de linfocitos T dirigidas contra M45 son "no inflacionarias", representando en general <1 % de linfocitos T CD8⁺ totales durante la infección por CMVM crónica. Las barras de error muestran la desviación típica (d.t.).

La FIG. 29 representa el análisis cinético de respuesta de linfocitos T CD8⁺ a CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. Se inmunizaron

ratones restringidos a H2^b 129S1/SvImJ/Cr (n=14) (i.p.) con una única dosis (1x10⁵ ufp) de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (clon 5D1). En los tiempos indicados, se tomaron muestras de sangre de los ratones y se midieron las respuestas de linfocitos T periféricos en sangre agrupada usando TCI con una incubación de 6 horas en presencia de BFA con péptidos. Todas las respuestas se normalizaron contra células estimuladas en ausencia de péptido. Las respuestas son contra NP de ZEBOV (negro) o M38 (gris) y M45 (blanco) de CMVM. Las barras de error muestran la d.t.

La FIG. 30 representa CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} que induce una respuesta de linfocitos T específica de ZEBOV en ratones C57BL/6. Se vacunaron (i.p.) ratones restringidos a H2^b C57BL/6 (n=6/grupo) usando 5x10⁵ ufp del clon de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} 5A1 o 5D1. Los grupos de control recibieron CMVM WT o diluyente (simulación). En la semana 4, los ratones se reforzaron como antes. En la semana 8 los ratones se recogieron para análisis de respuestas de linfocitos T de esplenocitos por TCI usando una incubación de 6 horas en presencia de BFA con el péptido indicado. Se usaron respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de CMVM contra M45 y M38 de CMVM como marcadores de infección por CMVM. El péptido de PSA actuó como un control de especificidad epitópica restringida a H2^b. Las células CD8⁺ con respuesta mostradas son dobles positivas para IFN-γ y TNFα. Los grupos de ratones presentados en esta figura se vacunaron en paralelo con grupos de ratones (n=14/grupo) usados para determinar la eficacia protectora del régimen de vacunación mostrado en la Figura 4. Las barras de error muestran la d.t.

La FIG. 31 representa eficacia protectora de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. Los grupos de ratones C57BL/6 (n=14) se vacunaron por administración i.p. de 5x10⁵ ufp de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (clones 5A1 o 5D1), CMVM WT o diluyente de DMEM (simulación), seguido de un refuerzo idéntico en la semana 4. Un grupo adicional recibió VSVΔG/ZEBOVGP como un control positivo para eficacia de vacuna. En la semana 10, los ratones se expusieron a 10³ de DL₅₀ de ma-ZEBOV (i.p.). Los datos representan (a) Porcentaje de supervivencia, (b) Cambio del peso corporal a lo largo del tiempo después de la exposición (las barras de error muestran la d.t.). (c) Los niveles de viremia en 3-4 ratones recogidos en el momento de la máxima viremia (día 4) (los niveles de viremia medios para grupo se muestran entre paréntesis). Para el peso corporal, los grupos se pesaron diariamente hasta 14 días después de la exposición a EBOV, o hasta que todos los animales en un grupo habían sucumbido a la enfermedad de ZEBOV. La vacunación con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} tuvo una influencia significativa en la supervivencia de exposición a ma-ZEBOV en comparación con controles de CMVM WT (p < 0,0001) usando un ensayo de rangos logarítmicos. El análisis de viremia de ma-ZEBOV muestra un nivel comparable de control de viremia entre grupos vacunados con CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}, en comparación con controles de CMVM WT (p < 0,0001). No se observaron diferencias significativas entre grupos vacunados con VSVΔG/ZEBOVGP y CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} en supervivencia, morbilidad (pérdida de peso) o viremia (p=0,3).

La FIG. 32 representa la caracterización genómica de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL}. Se digirió ADN de BAC de dos clones independientes de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (5A1 y 5D1) con EcoRI seguido de electroforesis. El patrón de digestión comparable entre clones de BAC de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} y el BAC de CMVM WT muestra la falta de cualquier reordenación genómica general.

La FIG. 33 muestra análisis de crecimiento multi-etapa de CMVM/ZEBOV-NP_{CTL} (5A1 y 5D1). Se infectaron MEF a una MOI de 0,1 con CMVM 5A1, 5D1 o WT. Se recogió sobrenadante los días indicados después de la infección y se valoró por ensayo en placas convencional. El ensayo se realizó por triplicado y se muestra la desviación típica.

Ejemplo 8: Vector de CMV recombinante con una supresión en el gen que codifica UL82 (pp71)

Este ejemplo se refiere a un CMVRh con replicación alterada que fue capaz de infectar animales sin exposición previa a CMV e inducir una respuesta inmunitaria específica de CMV. Se generó un CMVRh recombinante que carecía de la proteína del tegumento pp71 (codificada por Rh110). Se ha mostrado previamente que la proteína pp71 homóloga codificada por UL82 de CMVH estimula la expresión de genes tempranos inmediatos víricos y se reduce el crecimiento de CMVH que carece de pp71 en varios órdenes de magnitud *in vitro* (Cantrell *et al.*, J Virol 80:6188-6191, 2006; Preston y Nicholl, J Gen Virol 87:1113-1121, 2006; Saffert y Kalejta, J Virol 80: 3863-3871). De forma similar, CMVRh que carece de pp71 (CMVRhΔpp71, CMVRhΔRh110) crece solamente de forma escasa en fibroblastos de rhesus, pero se restauraron los títulos normales en fibroblastos de rhesus que expresaban de forma estable pp71 a partir de un vector retrovírico. La FIG. 36 muestra que la supresión de pp71 altera la liberación vírica de fibroblastos normales, pero no de fibroblastos que expresan pp71. Se generan dos vectores diferentes: CMVRhΔRh110 tiene una supresión génica de Rh110 que codifica pp71, en CMVRhΔRh110 retañe el gen de Rh110 se reemplaza con un casete de expresión para una proteína de fusión de las proteínas rev, tat y nef del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS). CMVRh-WT se refiere al virus parental (tipo silvestre). En el panel superior se infectan fibroblastos de rhesus que tienen vida prolongada por expresión de telomerasa (tRF) el día 0 con 0,01 virus por célula (multiplicidad de infección (MOI) = 0,01). El sobrenadante celular se recoge en cada uno de los días indicados y el título vírico se determina en tRF que expresan de forma estable pp71. Los datos indican que la supresión de pp71 redujo los títulos en más de 1000 veces de forma coherente con una deficiencia grave en la producción vírica. Para confirmar que este defecto de crecimiento se debe a la falta de la proteína pp71, se infectan tRF que expresan pp71 a una MOI de 0,01 y se recoge el sobrenadante. Como se muestra en el panel inferior, la misma cantidad de virus se liberó cuando estas células complementarias se infectan con virus ΔRh110 o WT.

La infección de RF que expresan pp71 permitió la generación de reserva de alto título para infección de MR no expuesto previamente a CMV. Se infectaron dos MR seronegativos s.c. con 10^7 UFP de CMVRh Δ pp71. La respuesta inmunitaria celular a CMVRh se supervisó en lavados broncoalveolares (BAL) y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a intervalos semanales usando tinción con citocinas intracelular como se ha descrito (Hansen *et al.*, Science 328(5974): 102-106, 2010; Hansen *et al.*, Nat Med 15: 293-299, 2009). Sorprendentemente, ambos animales desarrollaron una respuesta inmunitaria significativa a CMV en un periodo de dos semanas de infección que es comparable con animales de control históricos infectados con CMVRh-WT (FIG. 20).

La FIG. 37 (panel superior) muestra además que la respuesta de linfocitos T permaneció estable durante 245 días. Se inocularon dos macacos rhesus (MR) seronegativos s.c. con 10^7 unidades formadoras de placas (UFP) de CMVRh Δ Rh110 el día 0. La respuesta de linfocitos T CD8+ y CD4+ específica de CMV contra lisado de CMVRh se mide por ICCS en PBMC y BAL en los intervalos indicados. La respuesta inmunitaria es comparable a la de animales infectados con CMVRh WT (líneas negras). Estos resultados indican que a pesar de su atenuación grave, el virus con supresión de pp71 fue capaz de generar una respuesta inmunitaria de tipo WT de larga duración.

La FIG. 37 (paneles inferiores) demuestra que no se secreta CMVRh con alteración de la replicación de animales infectados. Para determinar si se secretó CMVRh con supresión de pp71 de los dos animales negativos para CMV infectados con CMVRh Δ Rh110 (Δ pp71) se concentró virus a partir de muestras de orina y se co-cultivó con fibroblastos que expresan pp71. Para el control, se infectaron dos animales positivos para CMV con CMVRh WT que expresaba CMVRhgag. La expresión de VISgag, proteína IE de CMVRh o la proteína celular GAPDH (incluida como control de carga) se determina a partir de cocultivos víricos mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos (S. G. Hansen *et al.* Science 328, 5974 (2010)). Los dos animales infectados con CMVRh(gag) secretaron CMVRh (como se muestra por expresión de IE) debido a que son positivos para CMV al inicio del experimento. El día 56, estos animales también secretan CMVRh que expresa VISgag lo que indica infección. Por el contrario, los dos MR negativos para CMV infectados con Δ Rh110 no secretaron CMVRh como se indica por la ausencia de cocultivos positivos para IE hasta el último punto temporal ensayado hasta el momento (día 231). Esto indica que Δ Rh110 está atenuado *in vivo* pero conserva la misma inmunogenicidad durante todo el tiempo del experimento (245 días). Este resultado indica adicionalmente que es poco probable que el virus con supresión de pp71 se transmita de un animal a otro. Por lo tanto, los vectores con supresión de pp71 tienen alteración de la replicación y son deficientes en propagación.

Este ejemplo se refiere además a un CMVRh con replicación alterada que expresa un antígeno heterólogo que fue capaz de superinfectar animales positivos para CMV e inducir una respuesta inmunitaria específica para el antígeno heterólogo. Para demostrar si los vectores con supresión de pp71 son capaces de superinfectar MR positivos para CMV e inducir una respuesta de linfocitos T de memoria efectora a largo plazo a un antígeno heterólogo, dos elementos esenciales de vacunas con vectores de CMV, se inoculan cuatro MR con vector con supresión de pp71 que expresan los antígenos de VIS rev/tat/nef junto con un vector WT que expresa el antígeno de VIS pol. Esta coinoculación permite la determinación de si existen diferencias en la cinética y duración de la respuesta de linfocitos T a los antígenos de VIS expresados por WT frente a vectores con replicación alterada.

La FIG. 38 muestra que los factores de CMV con supresión de pp71 que expresan un antígeno heterólogo son capaces de superinfectar animales infectados por CMV e inducir una respuesta inmunitaria de larga duración al antígeno heterólogo pero no se secretan. Panel superior: frecuencias medias (+/- ETM) de VISrev/tat/nef y linfocitos T CD8+ específicos de VISpol de linfocitos de sangre y lavado broncoalveolar (BAL) de 4 MR positivos para CMV inoculados simultáneamente con CMVRh que carece de pp71 y que expresa VISretanef (Δ pp71 CMVRh/rtn, en rojo) y vectores de tipo silvestre que expresan VISpol (CMVRh/pol wt, en azul). Se muestran respuestas específicas de VISrev/nef/tat de 6 MR a los que se proporcionó CMVRh/retanef wt como un control adicional para comparación (en negro). Las frecuencias de respuesta se determinaron por expresión de TNF α y/o IFN- γ intracelular después de estimulación con péptidos rev/tat/nef o pol solapantes. También se analizaron linfocitos T CD8+ que respondían a VISpol o VISretanef de sangre el día 133 después de la inoculación con respecto a fenotipo de memoria, se muestran la fracción de la respuesta específica de retanef o pol de VIS total con un fenotipo de linfocitos T de memoria central, T_{CM} (D28+/CCR7+), linfocitos T transicionales, T_{Trans-EM} (CD28+/CCR7-) y linfocitos T de memoria efectora, T_{EM} (CD28-/CCR7-). Estos datos muestran claramente que los vectores con supresión de pp71 conservan la capacidad para superinfectar animales ya infectados con CMV e inducen una respuesta de linfocitos T de memoria efectora a largo plazo a un antígeno heterólogo.

Panel inferior: cocultivo de orina después de inoculación de MR positivos para CMVRh con vectores de Δ pp71 CMVRh/retanef (MR3/MR4) frente a CMVRh wt/retanef (Con), respectivamente. Se recoge orina en los puntos temporales designados y se detecta la expresión de IE de CMVRh (infección primaria) o VISrev/tat/nef marcado con V5 (superinfección) mediante inmunotransferencia de lisados de cocultivo. Estos datos muestran que el vector con supresión de pp71 no se secreta de animales infectados lo que es coherente con la deficiencia en propagación. Tomados juntos, estos datos demuestran que la inmunogenicidad de vectores de CMV no está comprometida incluso cuando los vectores están gravemente alterados en su capacidad para replicar *in vivo* e *in vitro*.

Ejemplo 9: los Solicitantes observaron que pueden eliminarse múltiples genes de CMV sin comprometer los elementos que los Solicitantes consideren esenciales para la eficacia del vector, específicamente la capacidad para

superinfectar y establecer expresión de antígenos a largo plazo y por lo tanto la inducción de respuesta de linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) duraderas. Los datos de los Solicitantes revelaron un número sorprendentemente grande de genes que pueden suprimirse sin comprometer la capacidad de CMVRh para superinfectar e inducir respuestas de T_{EM} a largo plazo. Específicamente, los Solicitantes han construido un panel de recombinantes de CMVRh/gag que contienen grandes supresiones génicas (hasta 10 kb cada una) que juntas comprenden 30 kb (24 genes) (Tabla 6, FIG. 34).

Tabla 6

Regiones génicas de CMVRh no esenciales para el crecimiento <i>in vivo</i>	Candidatos de CMVRh para reemplazo (% de identidad con CMVH)	Candidatos de CMVH homólogos (clase cinética)
Rh13-Rh29 (familia RL11)	Rh13.1 (40 %), Rh20 (26 %), Rh19 (34 %), Rh24 (35 %), Rh23 (36 %)	RL11 (L), UL6 (?), UL7 (L), UL9 (L), UL11 (E)
Rh111-Rh112 (pp65)	Rh112 (35 %)	UL83 (L) (pp65)
Rh191-Rh202 (familia US12)	Rh190 (33 %), Rh192 (24 %), Rh196 (29 %), Rh198 (36 %), Rh199 (32 %), Rh200 (29 %), Rh201 (40 %), Rh202 (58 %)	US12 (E), US13 (E), US14 (E), US17 (E), US18 (E), US19 (E), US20 (E), US21 (?)
Rh214-Rh220 (familia US28)	Rh220 (37 %)	US28 (E)

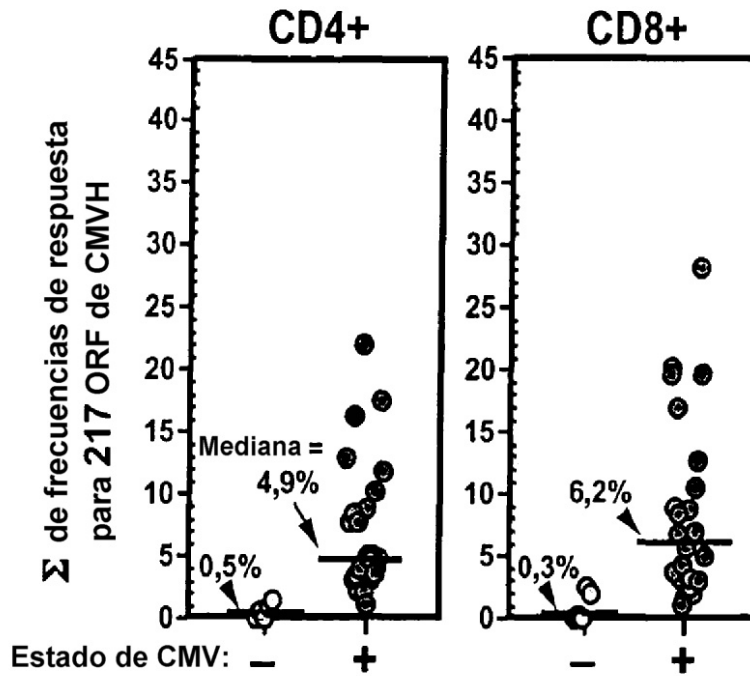
La mayoría de estos genes y familias génicas están conservados en CMVH y se sabe que no son esenciales para el crecimiento de CMVH *in vitro* (Yu, D., M. C. Silva, y T. Shenk. 2003. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12396-401). La supresión de estos genes en CMVRh no afectó a las características de crecimiento *in vitro*, la eficacia de superinfección, la persistencia, la diseminación o la inmunogenicidad de vectores de CMVRh/gag (FIG. 35) y por lo tanto cualquier gen individual o grupo génico en estas regiones prescindibles pueden reemplazarse claramente con antígenos heterólogos.

Habiendo descrito por lo tanto en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por los párrafos anteriores no está limitada a detalles particulares expuestos en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones evidentes de los mismos como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de CMVRh o CMVH recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, en el que el antígeno heterólogo es un antígeno específico de patógeno humano aislado de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en el que el vector incluye una supresión de uno o más genes de CMVRh o CMVH que son esenciales para o aumentan la replicación.
2. El vector de CMVRh o CMVH recombinante de la reivindicación 1, en el que el al menos un gen esencial o de aumento se selecciona de UL82, UL94, UL32, UL99, UL115 o UL44, o un homólogo de los mismos.
3. El vector de CMVRh o CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende una supresión de US2, US3, US6 o US11 o un homólogo de los mismos, en particular que comprende una supresión de rh158-166 o un homólogo del mismo.
4. El vector de CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una supresión de UL64 o US29, o una combinación de los mismos.
5. El vector de CMVRh o vector de CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el vector de CMVRh o vector de CMVH tiene una supresión en regiones génicas que son esenciales para el crecimiento *in vivo*, en particular en el que las regiones génicas se seleccionan del grupo que consiste en la familia RL11, la familia pp65, la familia US21 y la familia US28.
6. El vector de CMVRh recombinante de la reivindicación 5, en el que las regiones génicas de CMVRh se seleccionan del grupo que consiste en Rh13-Rh29, Rh111-Rh112, Rh191-Rh202 y Rh214-Rh220, en particular en el que las regiones génicas de CMVRh se seleccionan del grupo que consiste en Rh13.1, Rh19, Rh20, Rh23, Rh24, Rh112, Rh190, Rh192, Rh196, Rh198, Rh199, Rh200, Rh201, Rh202 y Rh220.
7. El vector de CMVH recombinante de la reivindicación 5, en el que las regiones génicas de CMVH se seleccionan del grupo que consiste en RL11, UL6, UL7, UL9, UL11, UL83 (pp65), US12, US13, US14, US17, US18, US19, US20, US21 y UL28.
8. El vector de CMVRh o CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el vector comprende sitios *LoxP* que flanquean un gen o región esencial del genoma de CMVRh o CMVH.
9. El vector de CMVRh o CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica Cre recombinasa regulada por tetraciclina (Tet).
10. Una composición que comprende el vector de CMVRh o CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El vector de CMVRh o CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición de la reivindicación 10, para su uso en un método para tratar a un sujeto con una enfermedad infecciosa, en el que la enfermedad infecciosa está provocada por el virus de la inmunodeficiente humana (VIH).
12. El vector de CMVRh o CMVH recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la composición de la reivindicación 10, para su uso en un método para tratar a un sujeto en riesgo de infectarse con una enfermedad infecciosa, en el que la enfermedad infecciosa está provocada por el VIH.

% de respuesta de linfocitos T de SP totales:



% de respuesta de linfocitos T de SP de memoria:

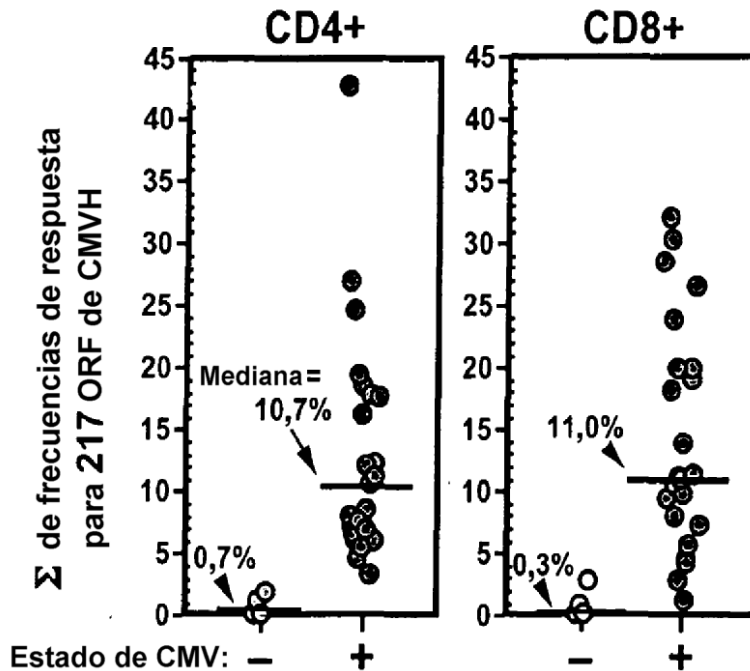


FIG. 1

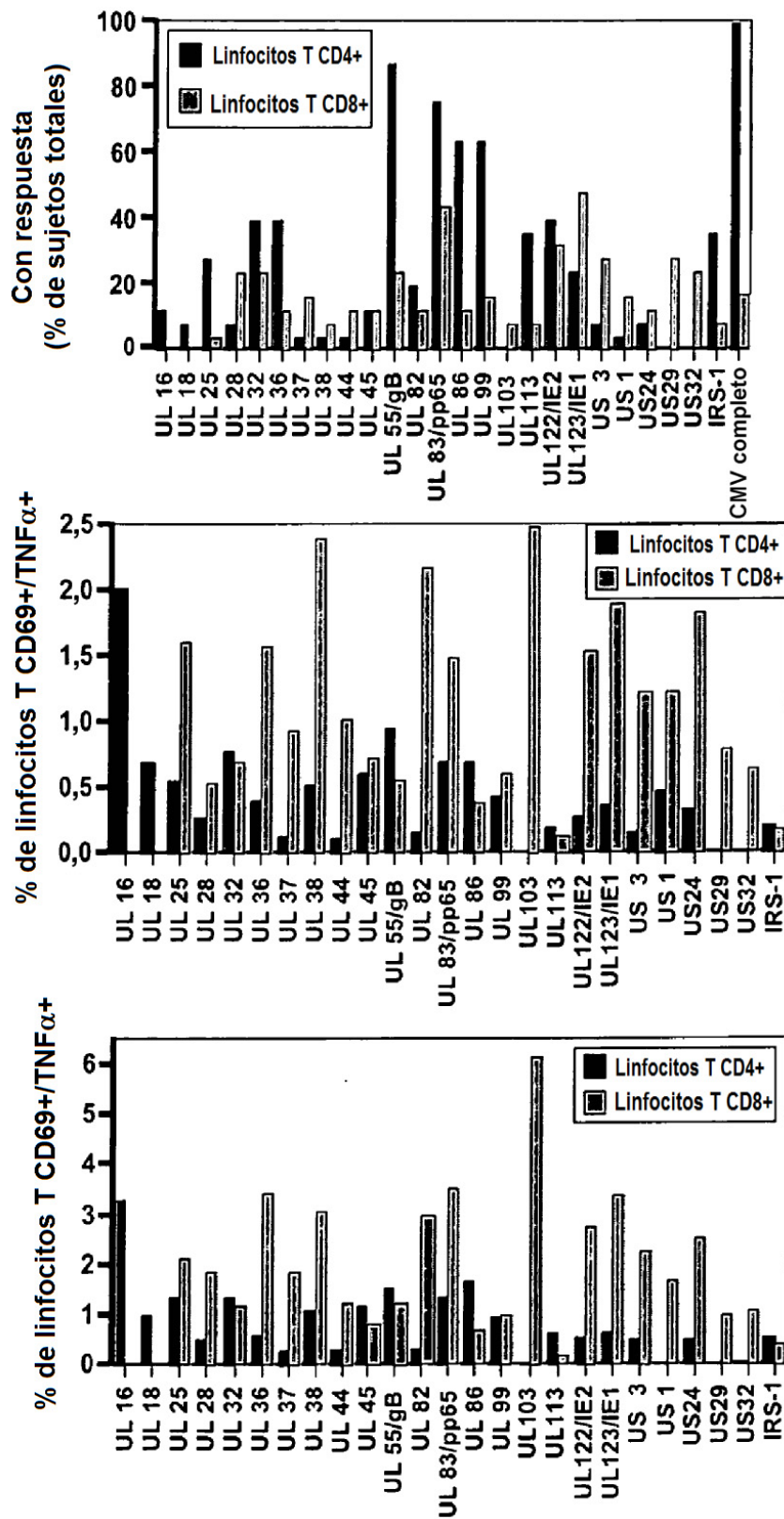


FIG. 2

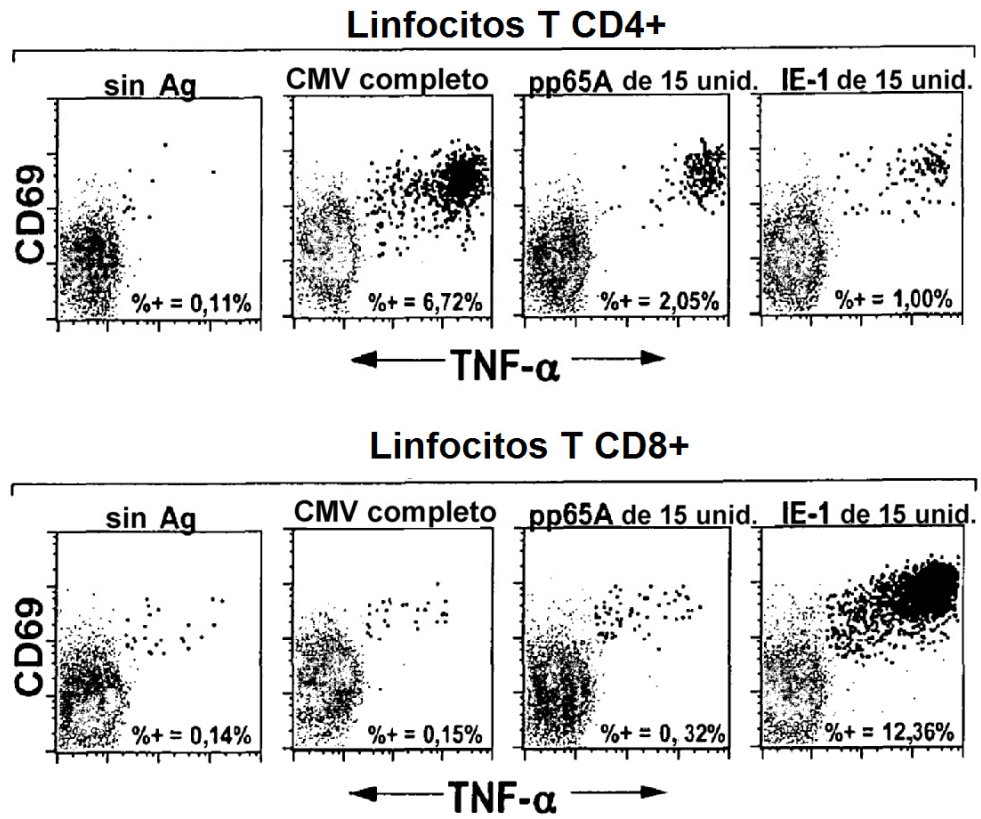
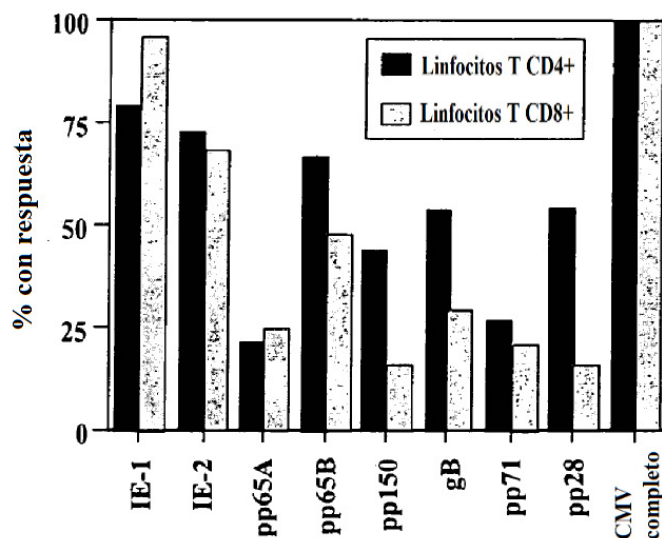


FIG. 3

% de MR sero + para CMV con respuesta a linfocitos T
($\geq 0,1$ % para ORF de CMV completo o CMV seleccionado)



Frecuencias de respuesta de linfocitos T medias
a ORF de CMV completo o CMV seleccionado entre MR con respuesta

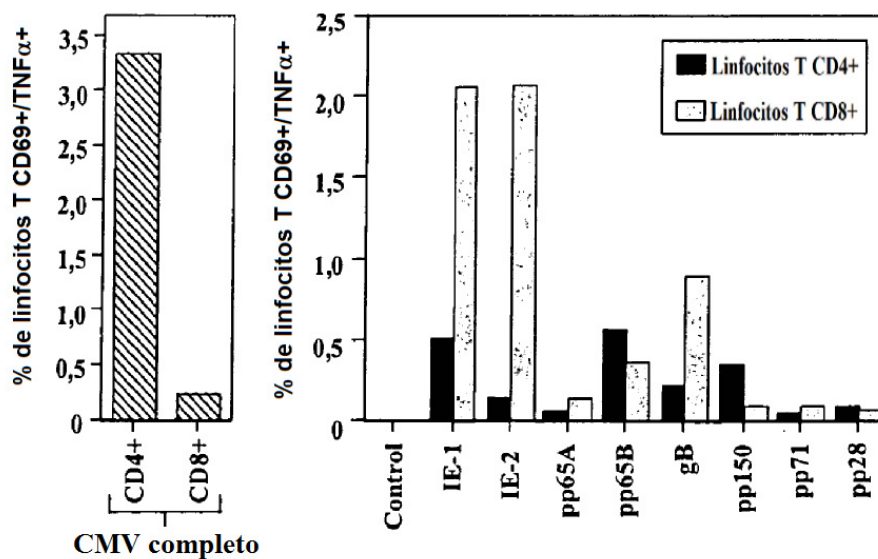


FIG. 4

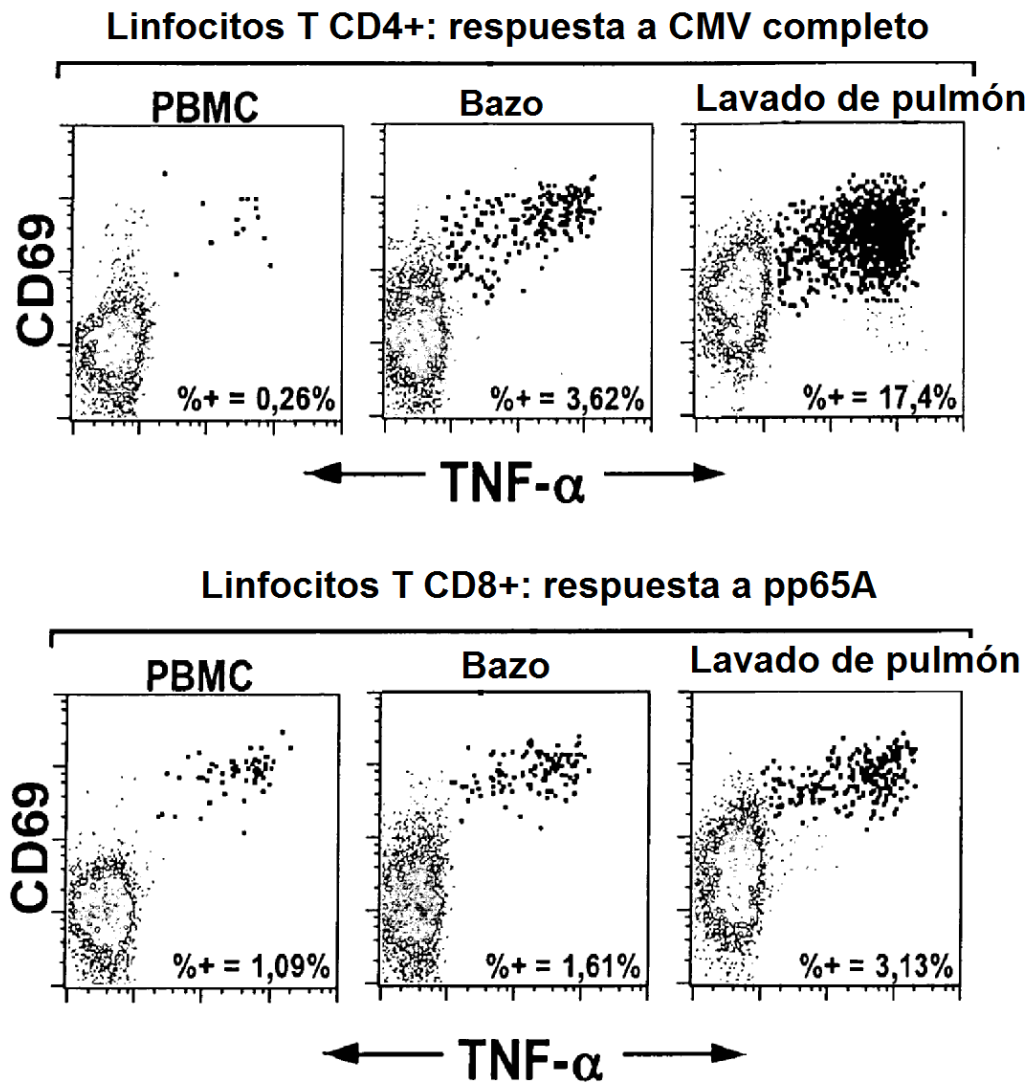


FIG. 5

A

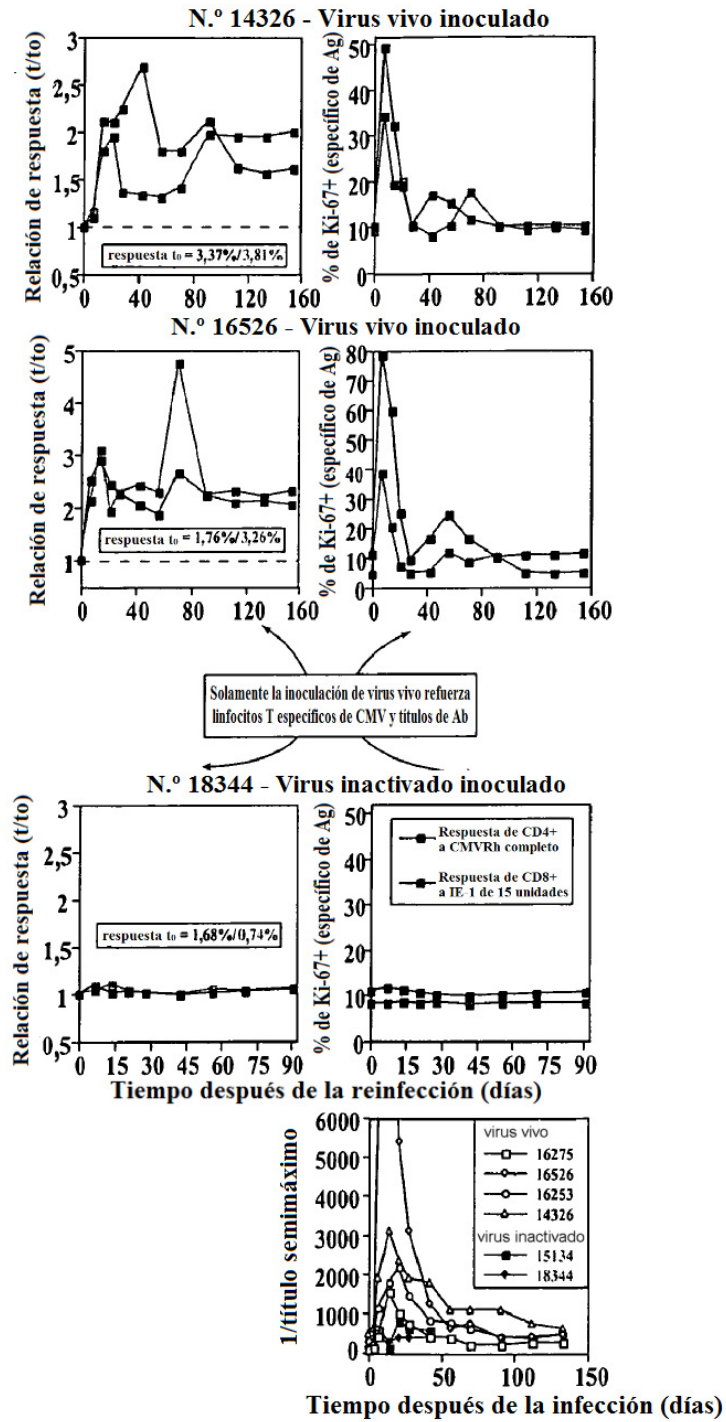


FIG. 6A

B

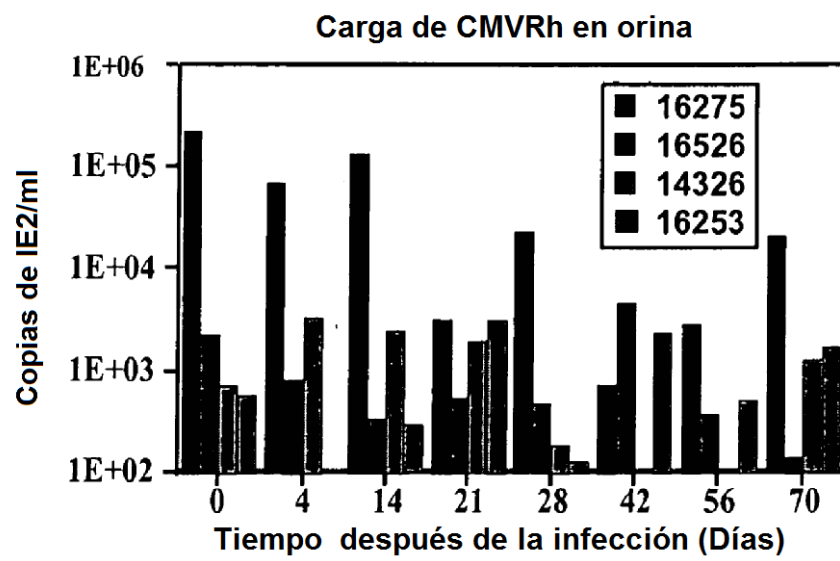


FIG. 6B

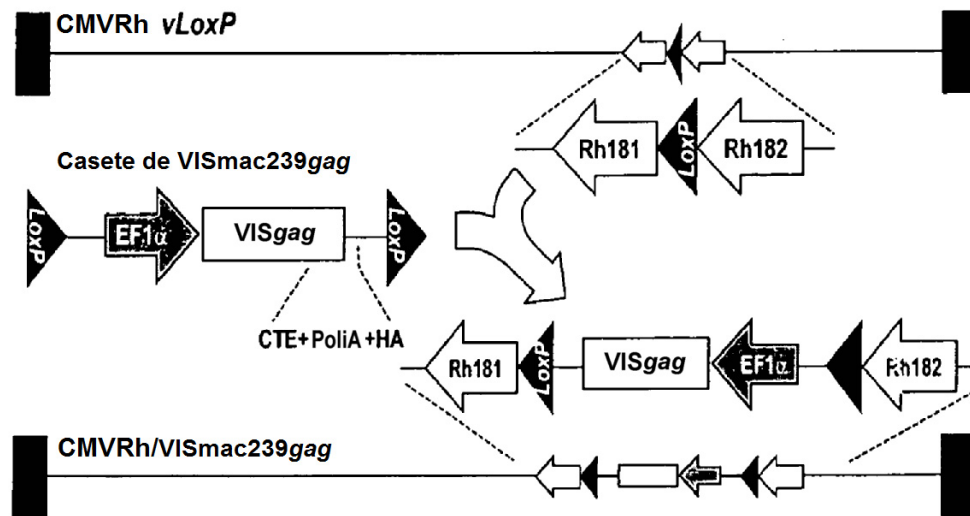


FIG. 7

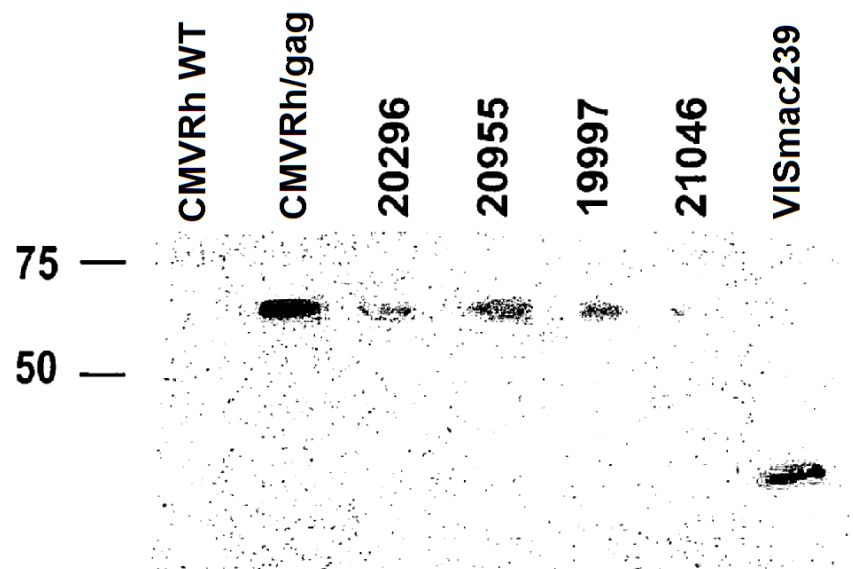


FIG. 8

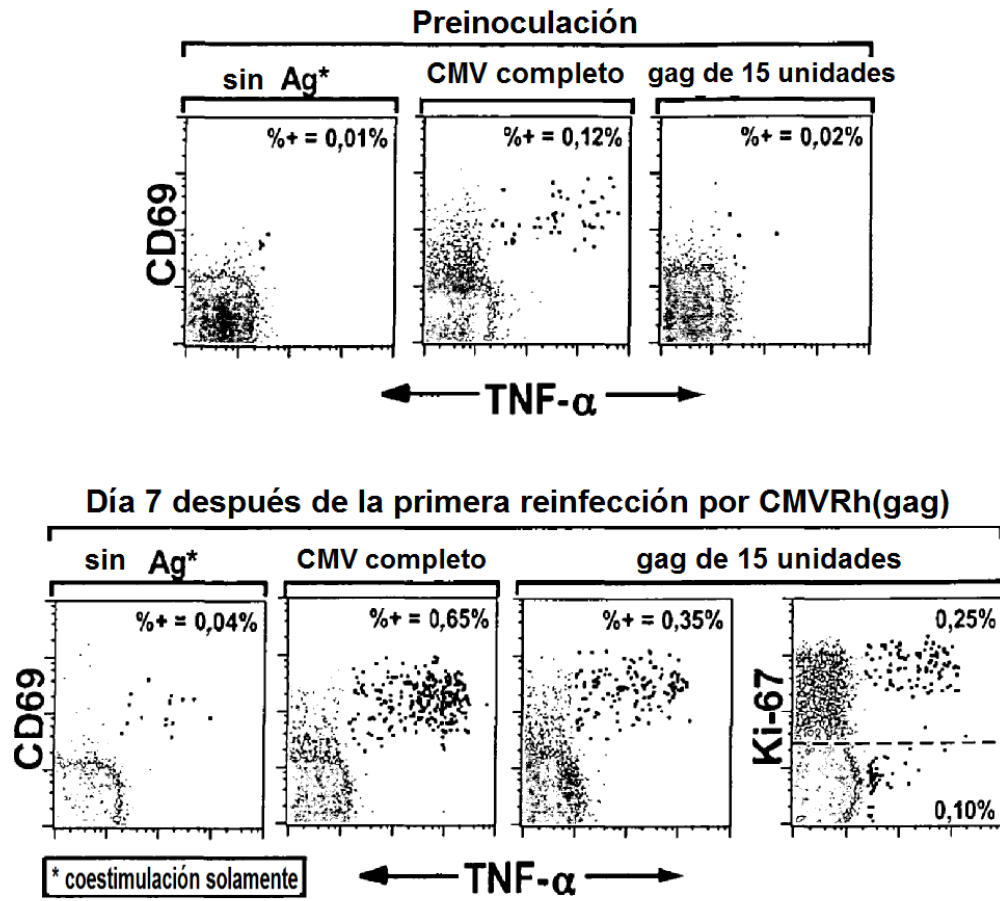


FIG. 9

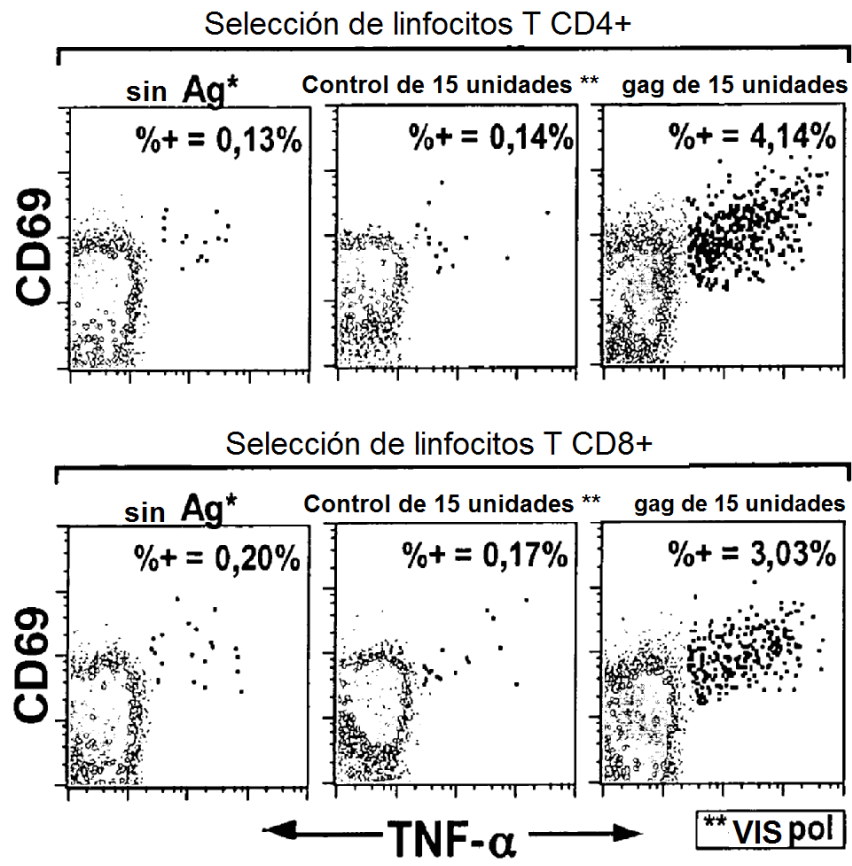


FIG. 10

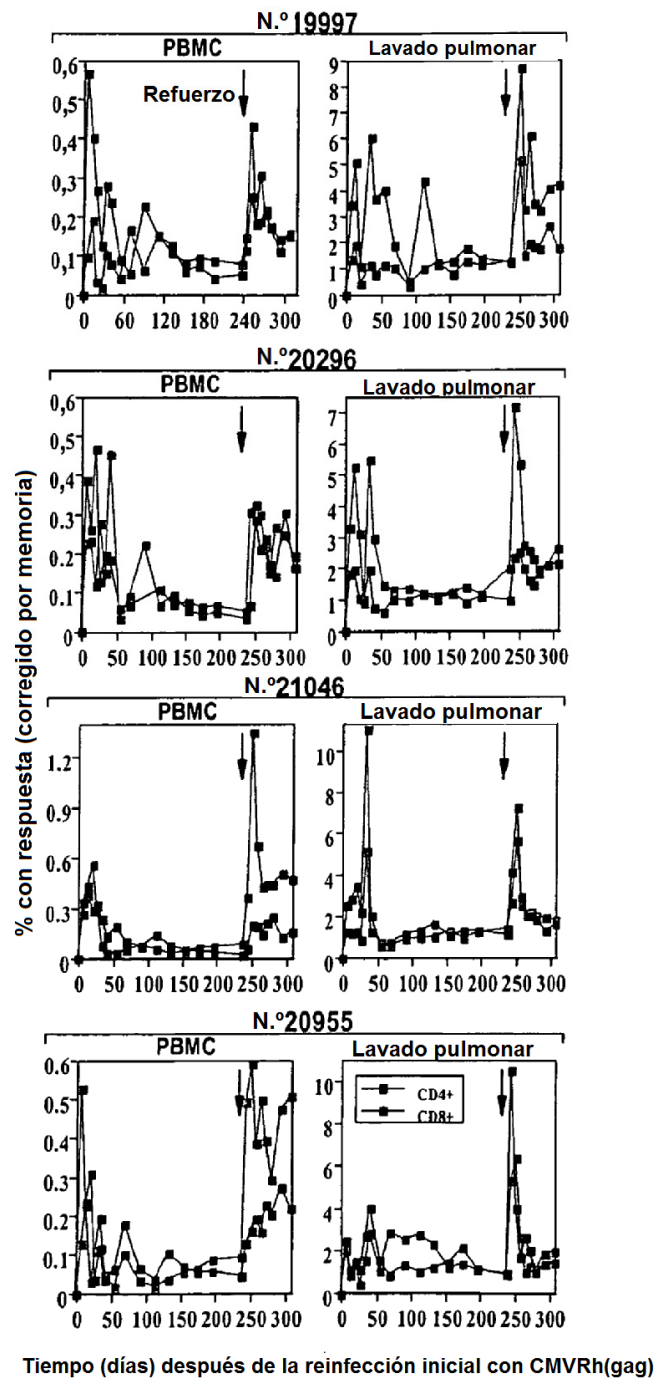


FIG. 11

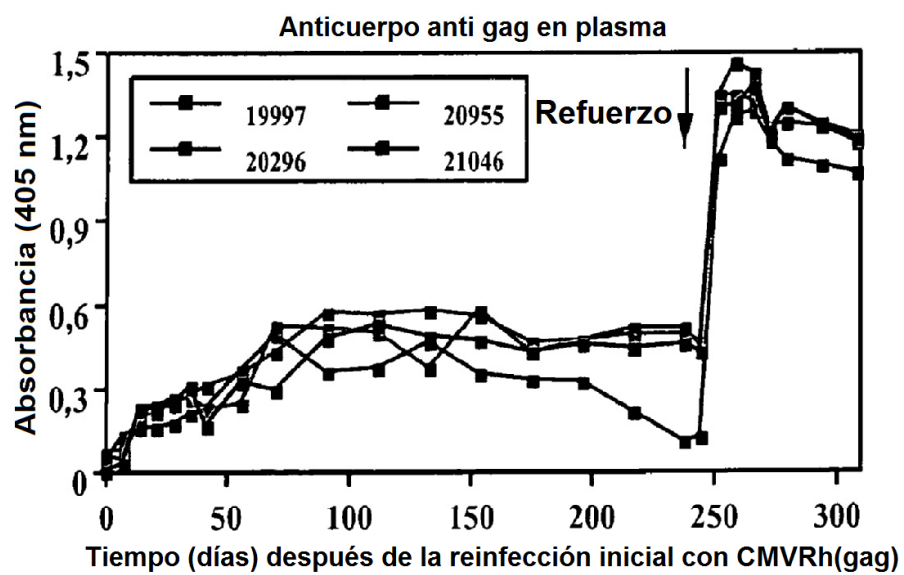


FIG. 12

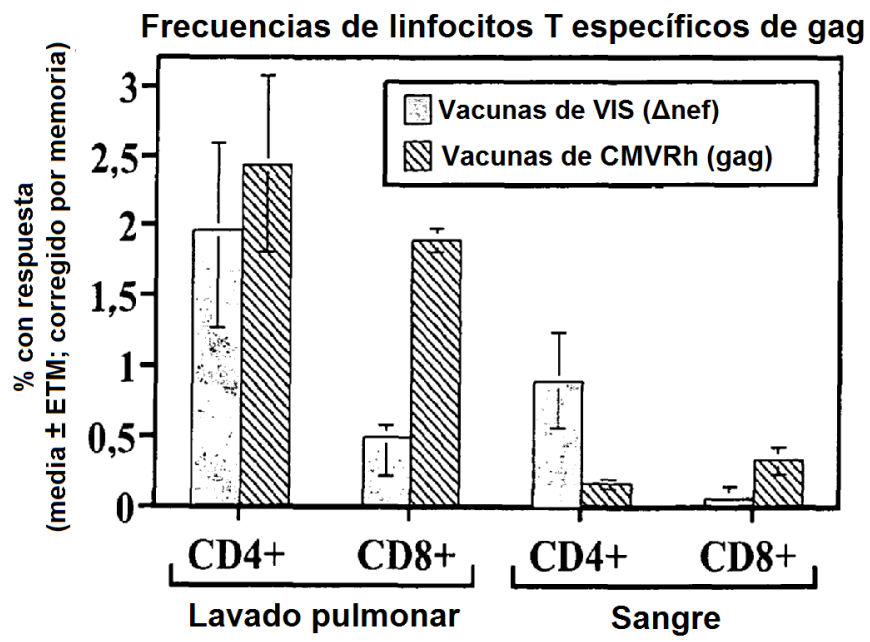


FIG. 13

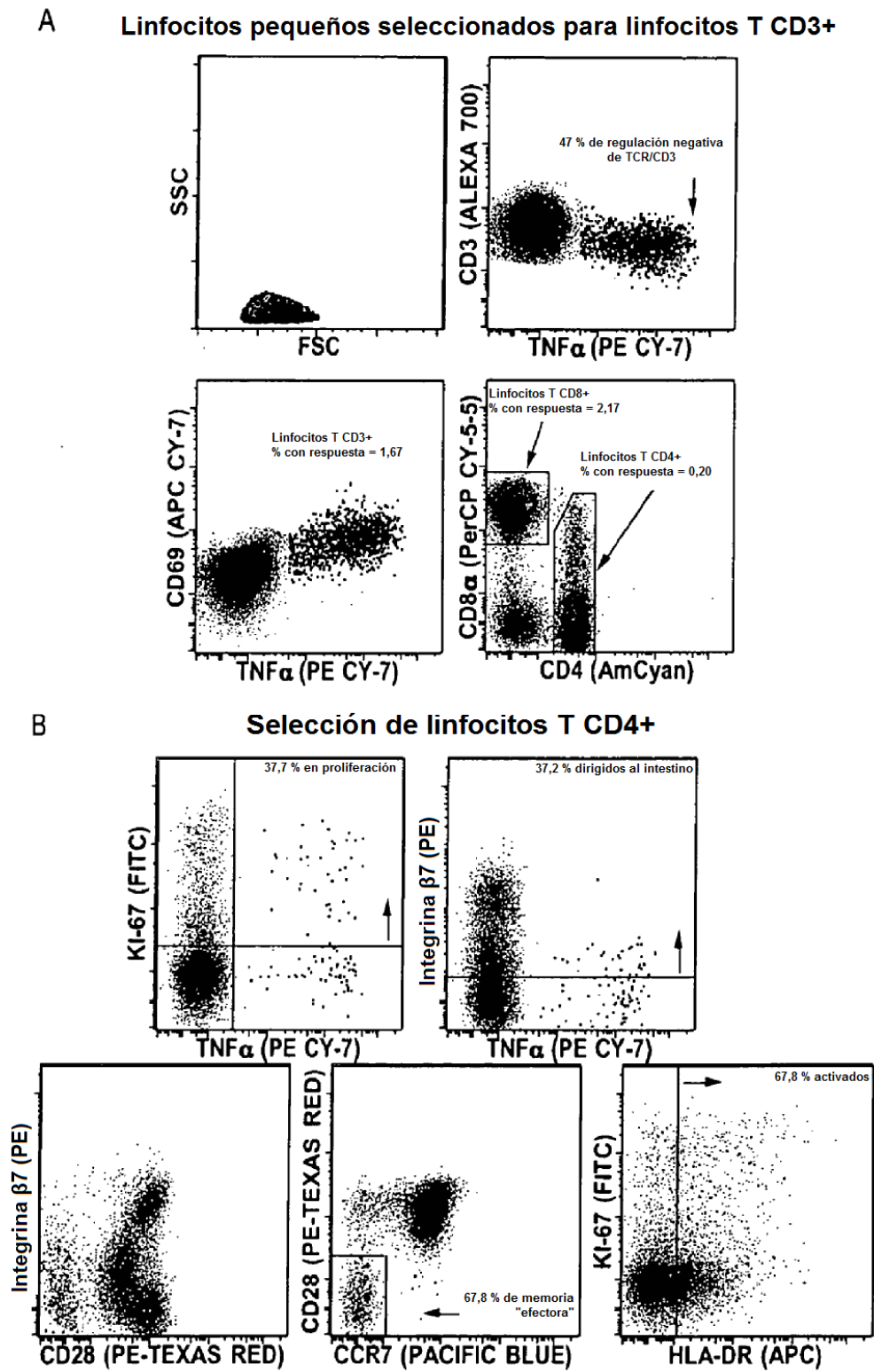


FIG. 14A-14B

C

Selección de linfocitos T CD8+

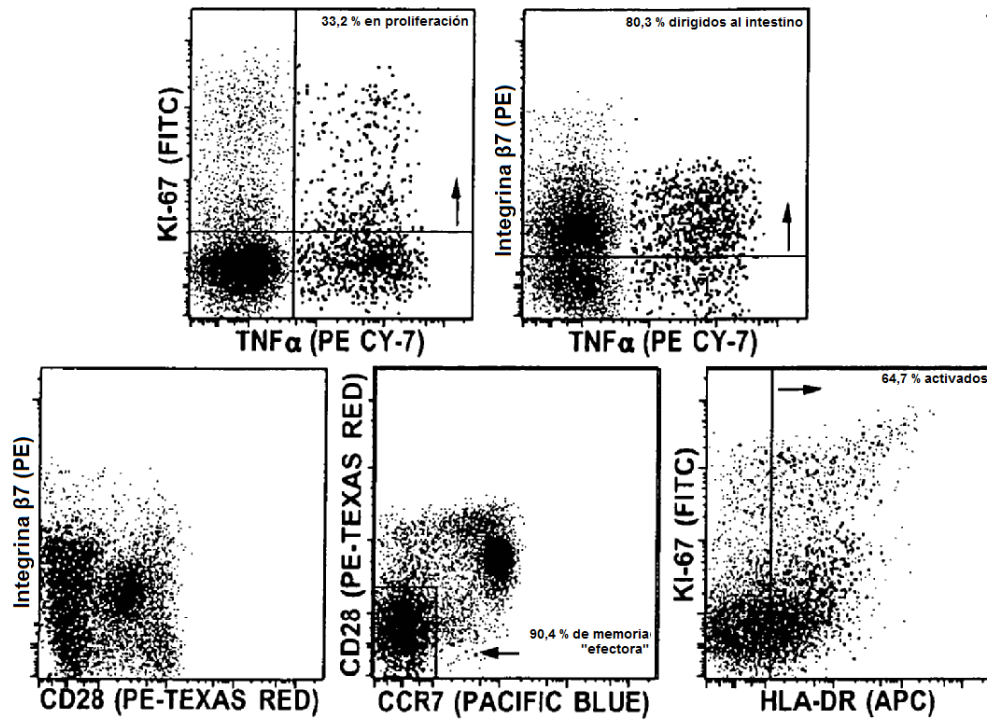


FIG. 14C

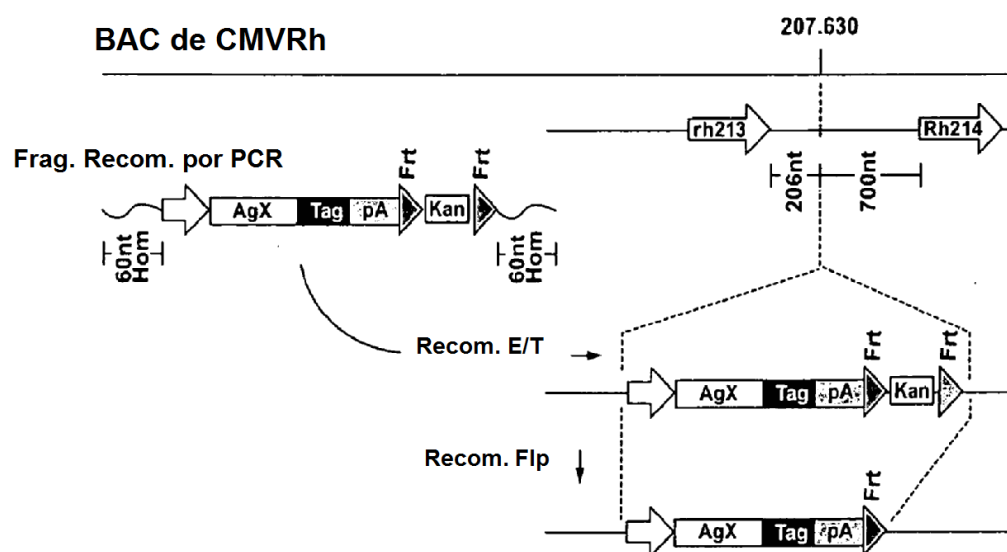


FIG. 15

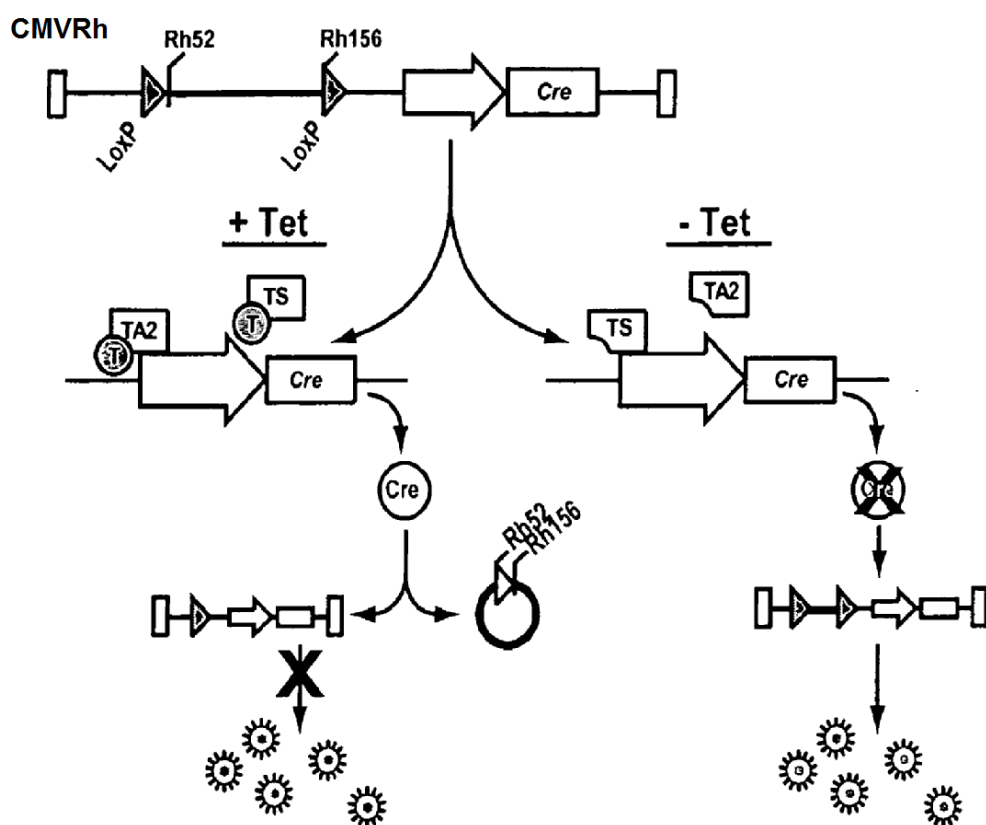


FIG. 16

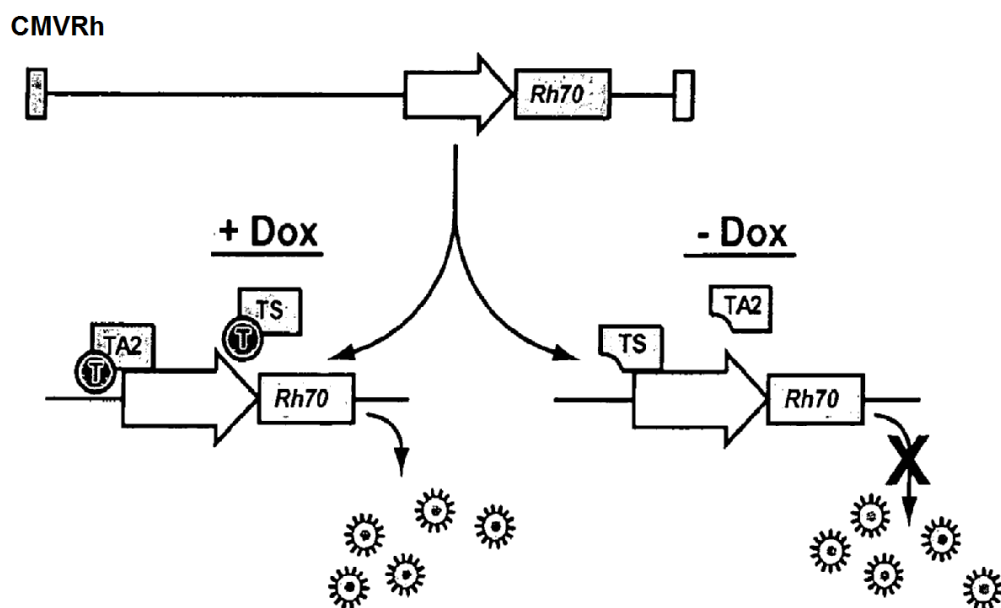


FIG. 17

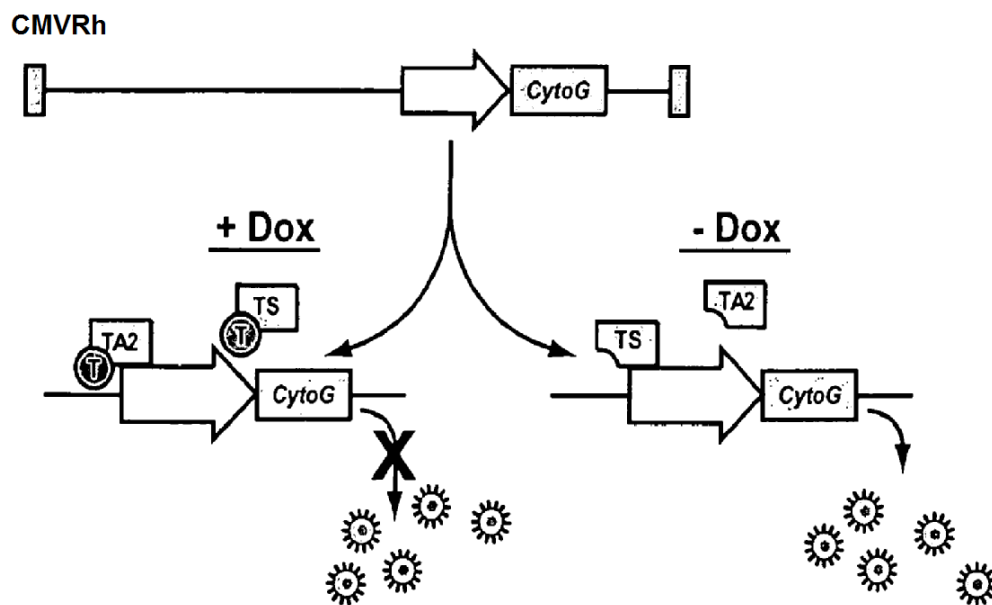


FIG. 18

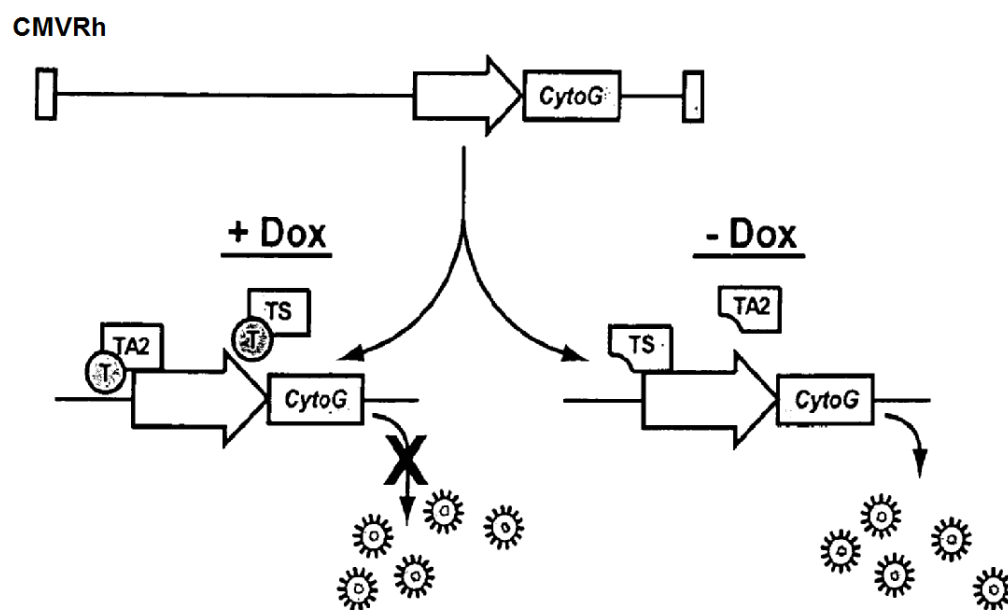


FIG. 19

Respuesta de linfocitos T a IE 1/2 + pp65 (15 unidades; solapamiento de 4 AA)

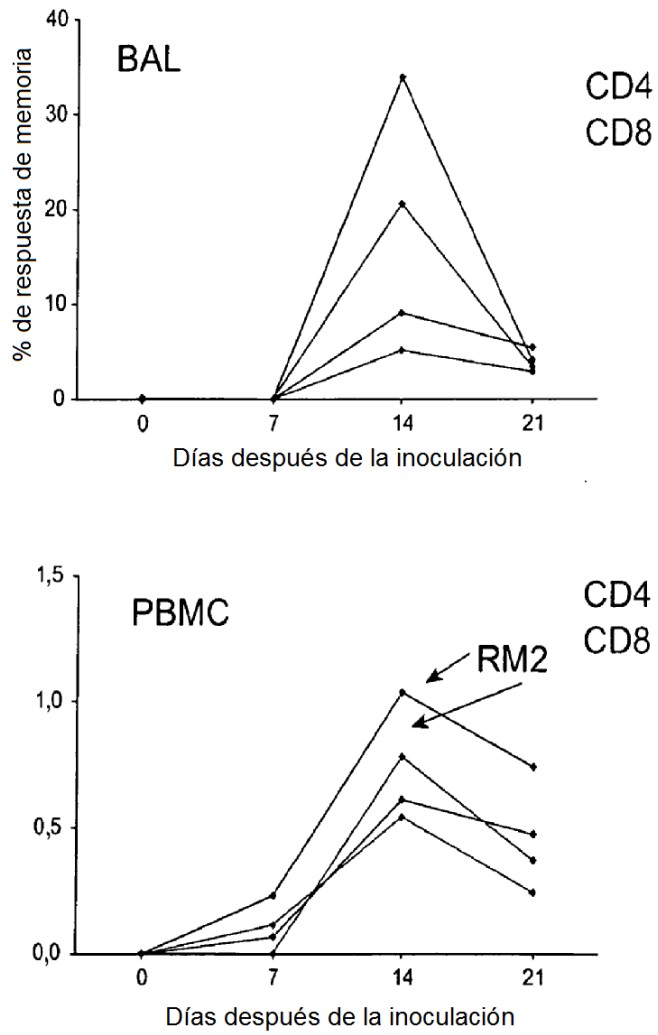


FIG. 20

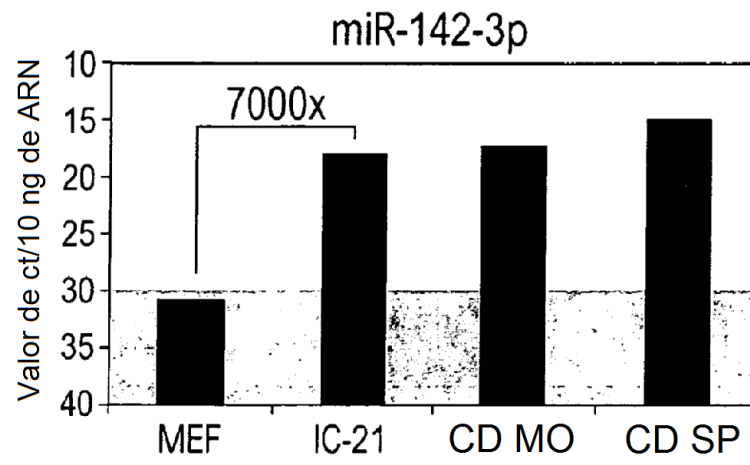


FIG. 21

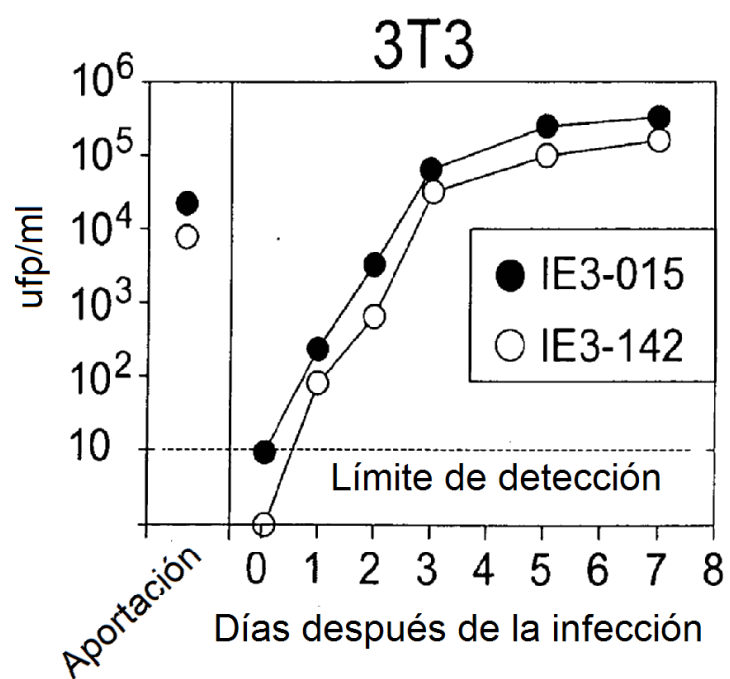


FIG. 22

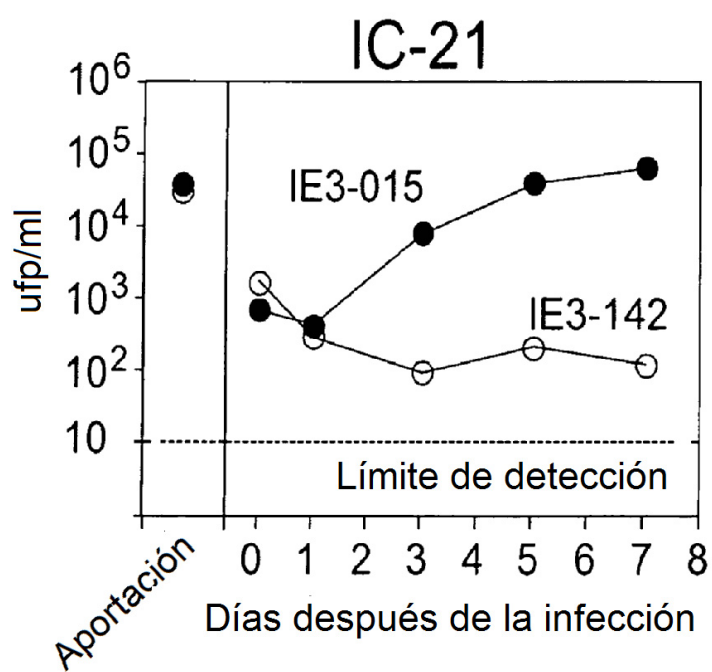


FIG. 23

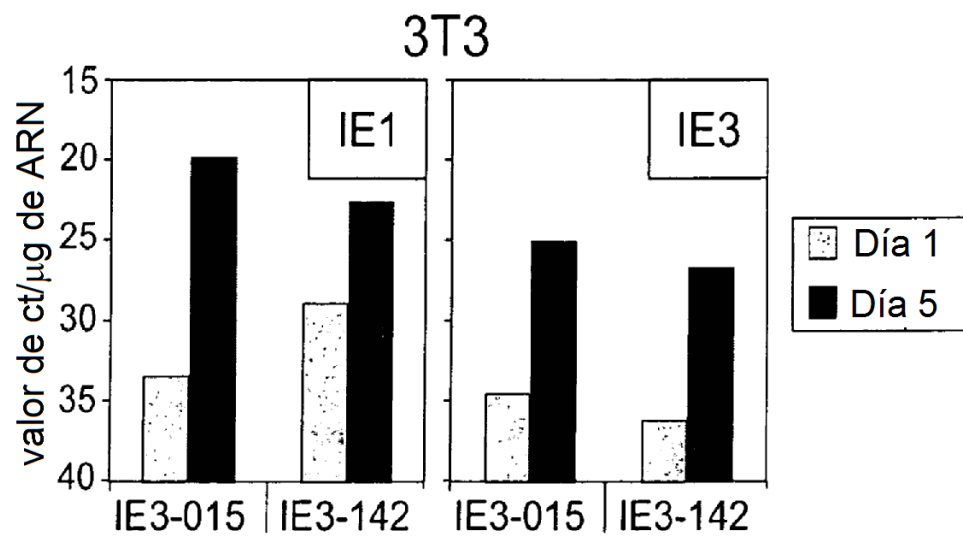


FIG. 24

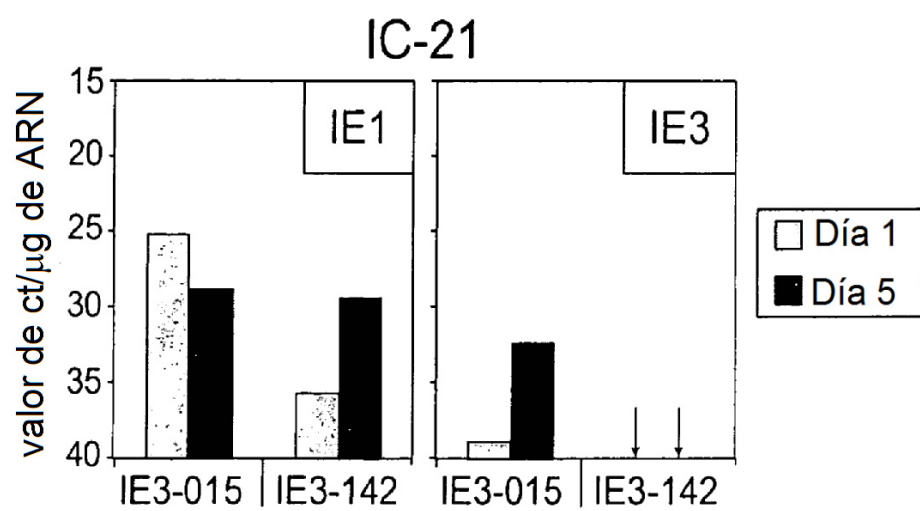


FIG. 25

**Evaluación inmunológica y virológica
de vectores de CMVRh/VIS defectuosos en replicación frente a wt**

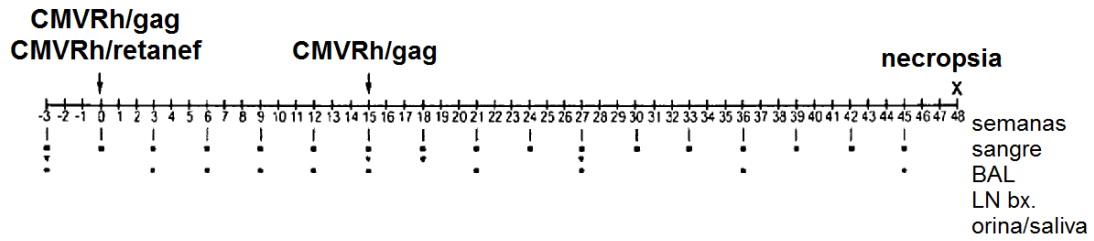


FIG. 26

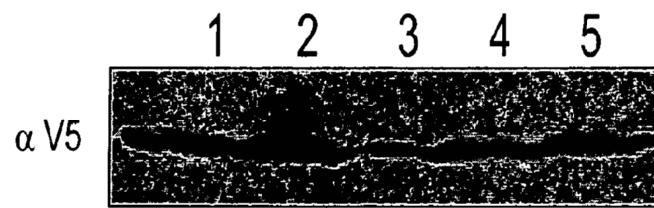


FIG. 27

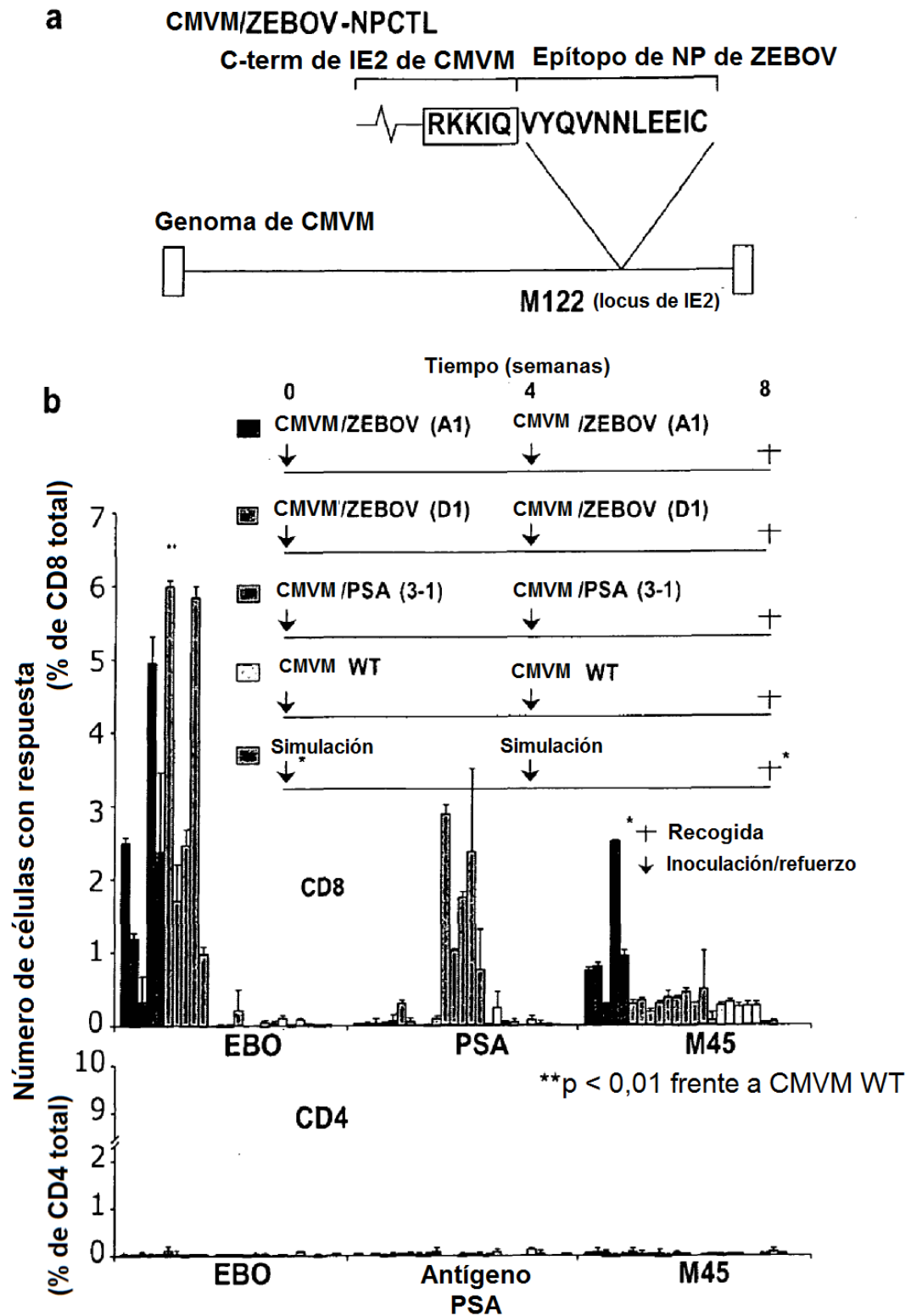


FIG. 28A-28B

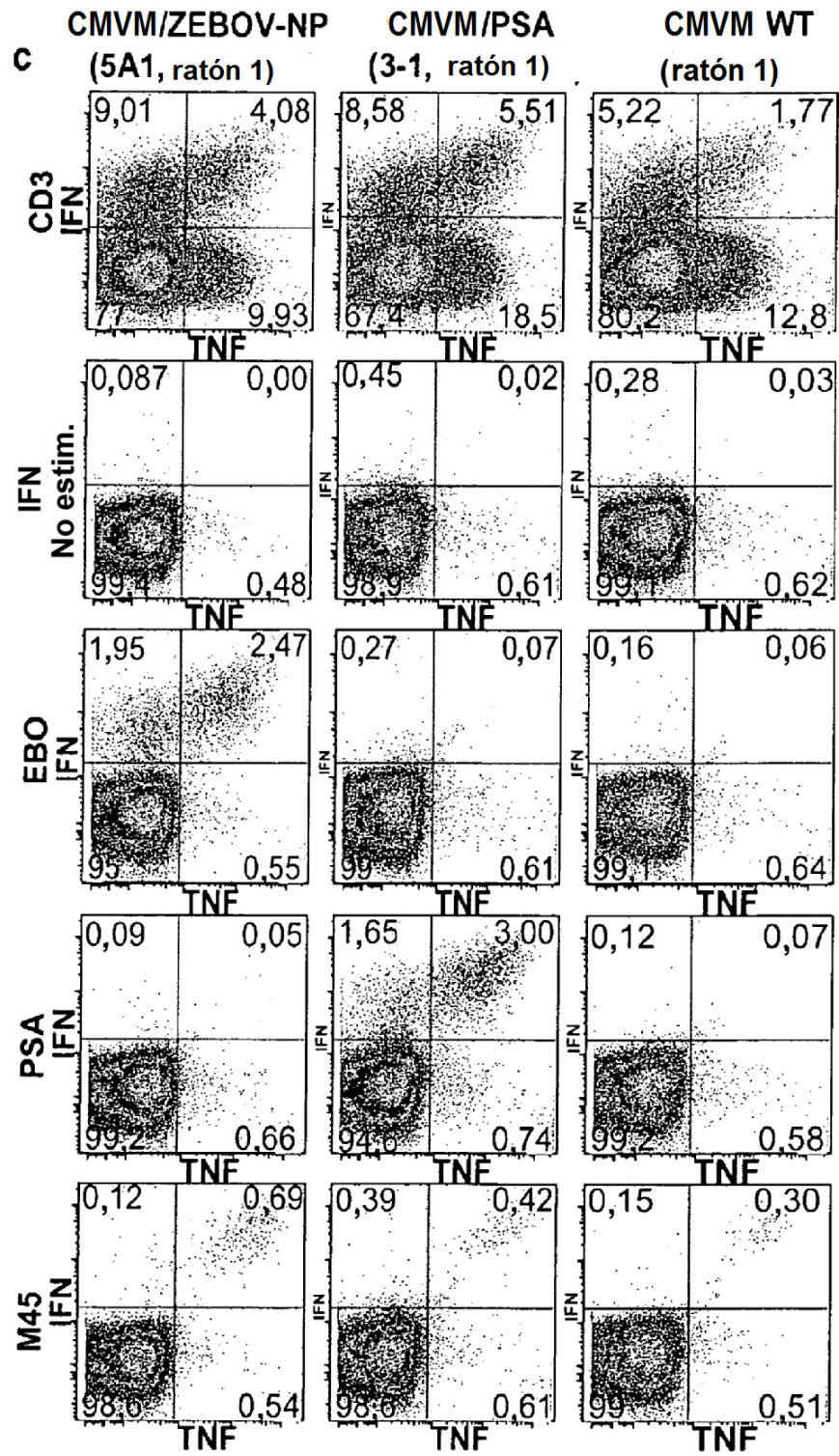


FIG. 28C

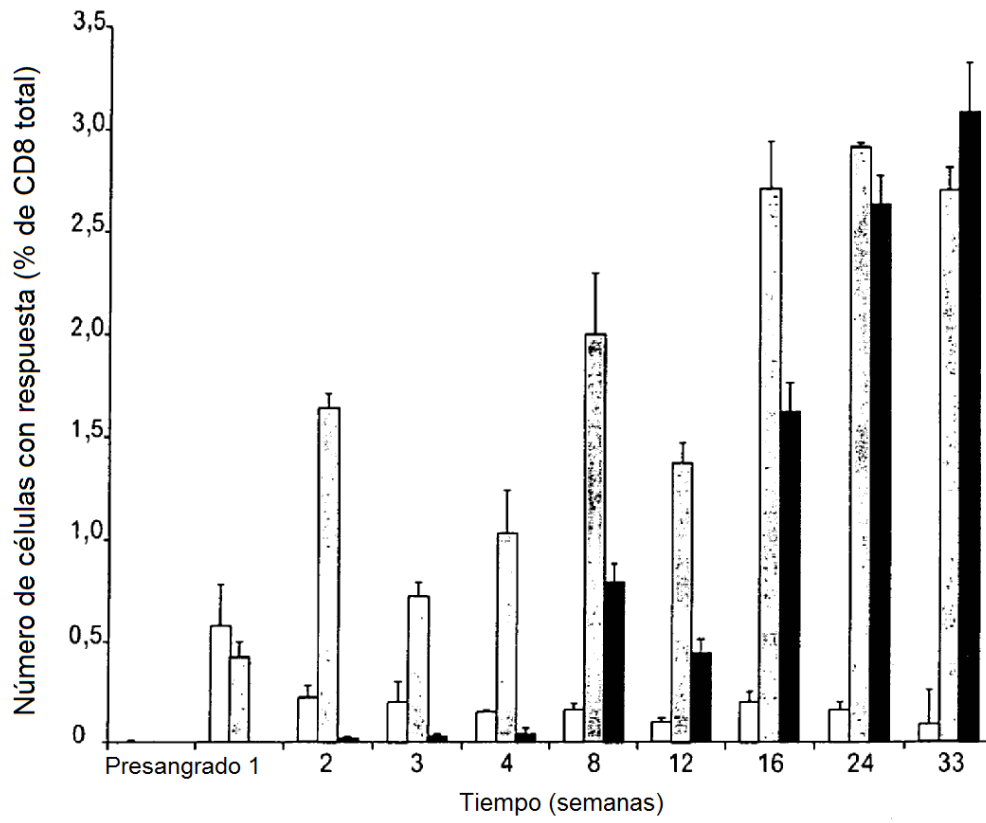


FIG. 29

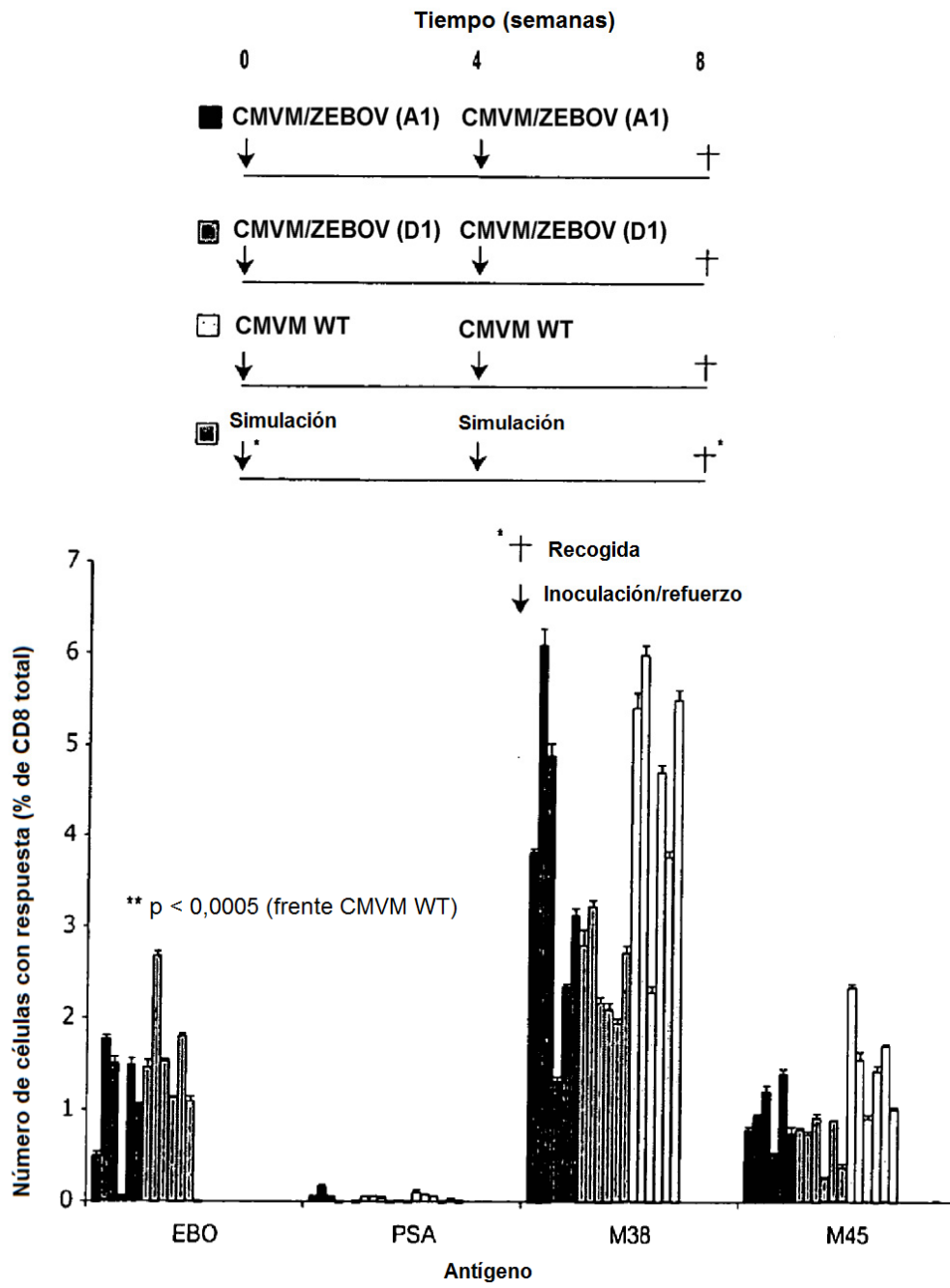


FIG. 30

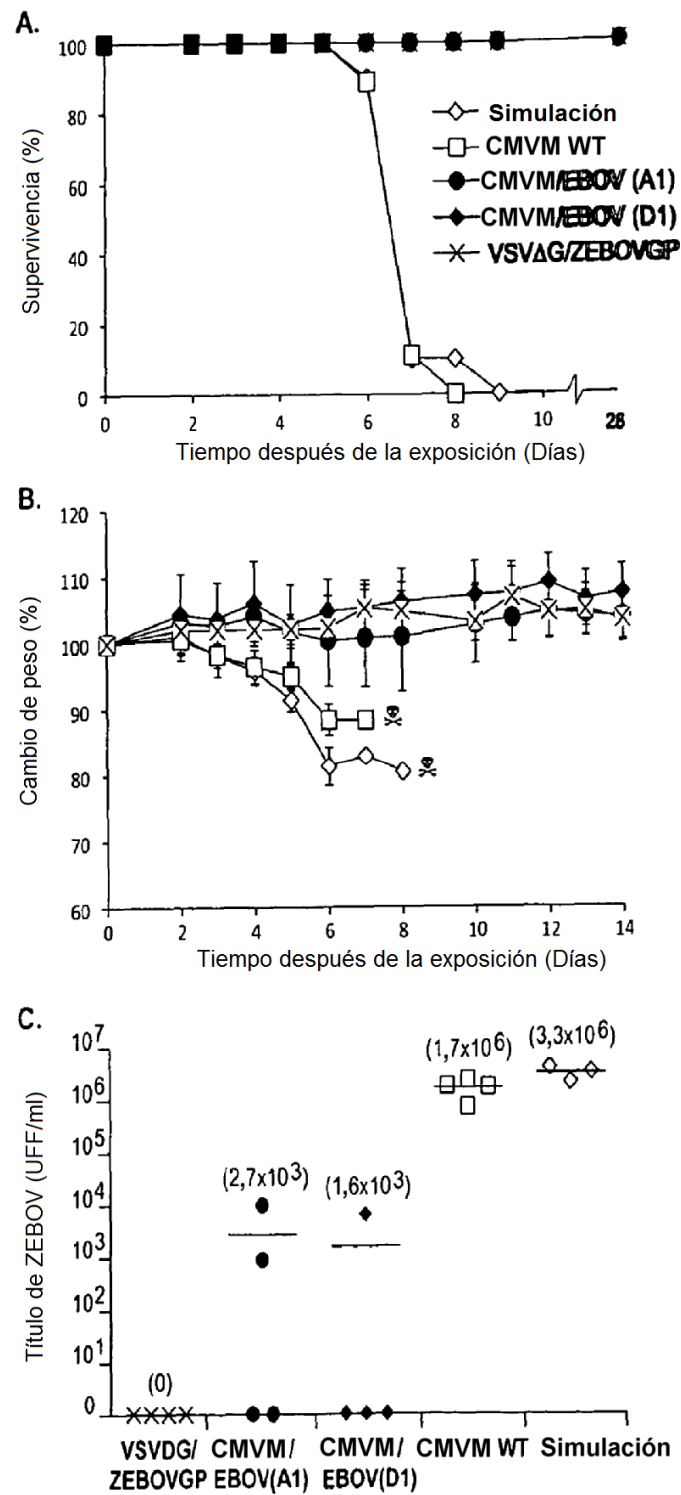


FIG. 31A-31C

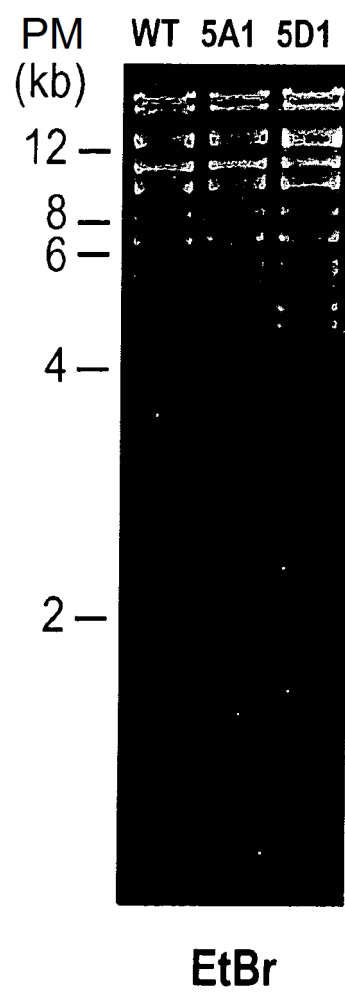


FIG. 32

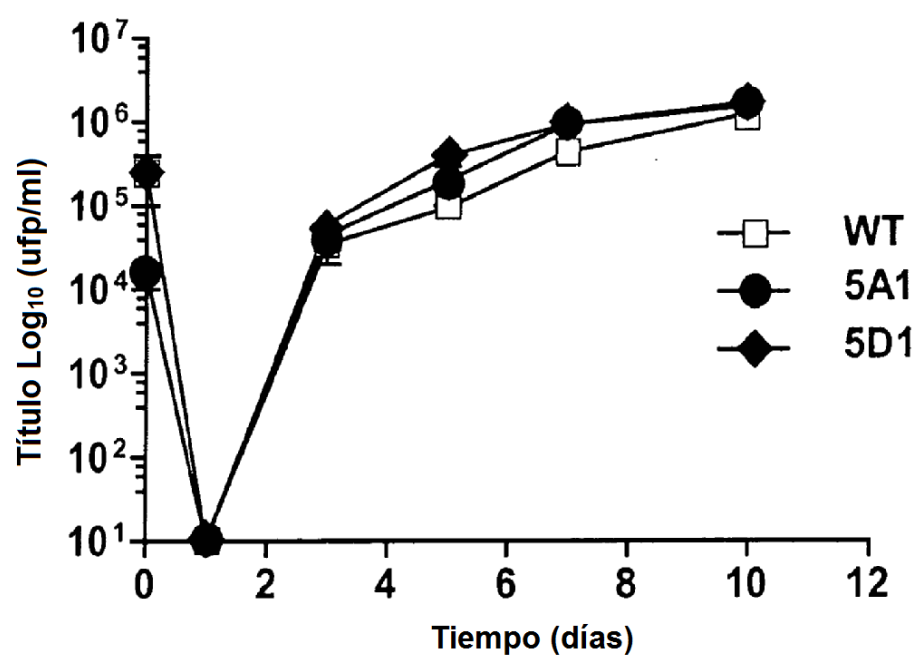
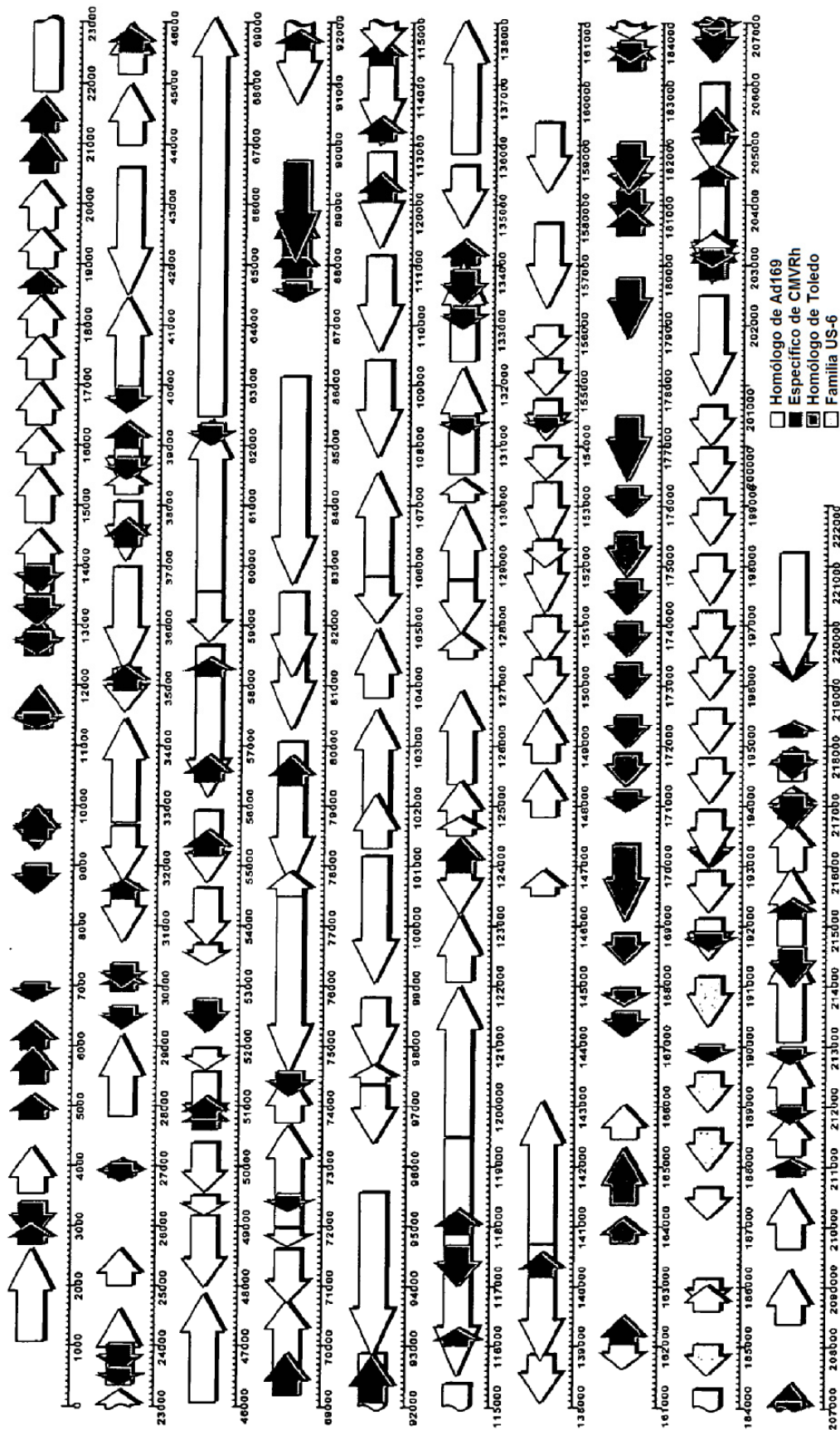


FIG. 33



**Inmunogenicidad de vectores de CMVRh/VIS
con supresión de genes específicos o familias génicas
(respuestas de linfocitos T CD8+ específicas de VISgag
o VISrtn; linfocitos de lavado broncoalveolar)**

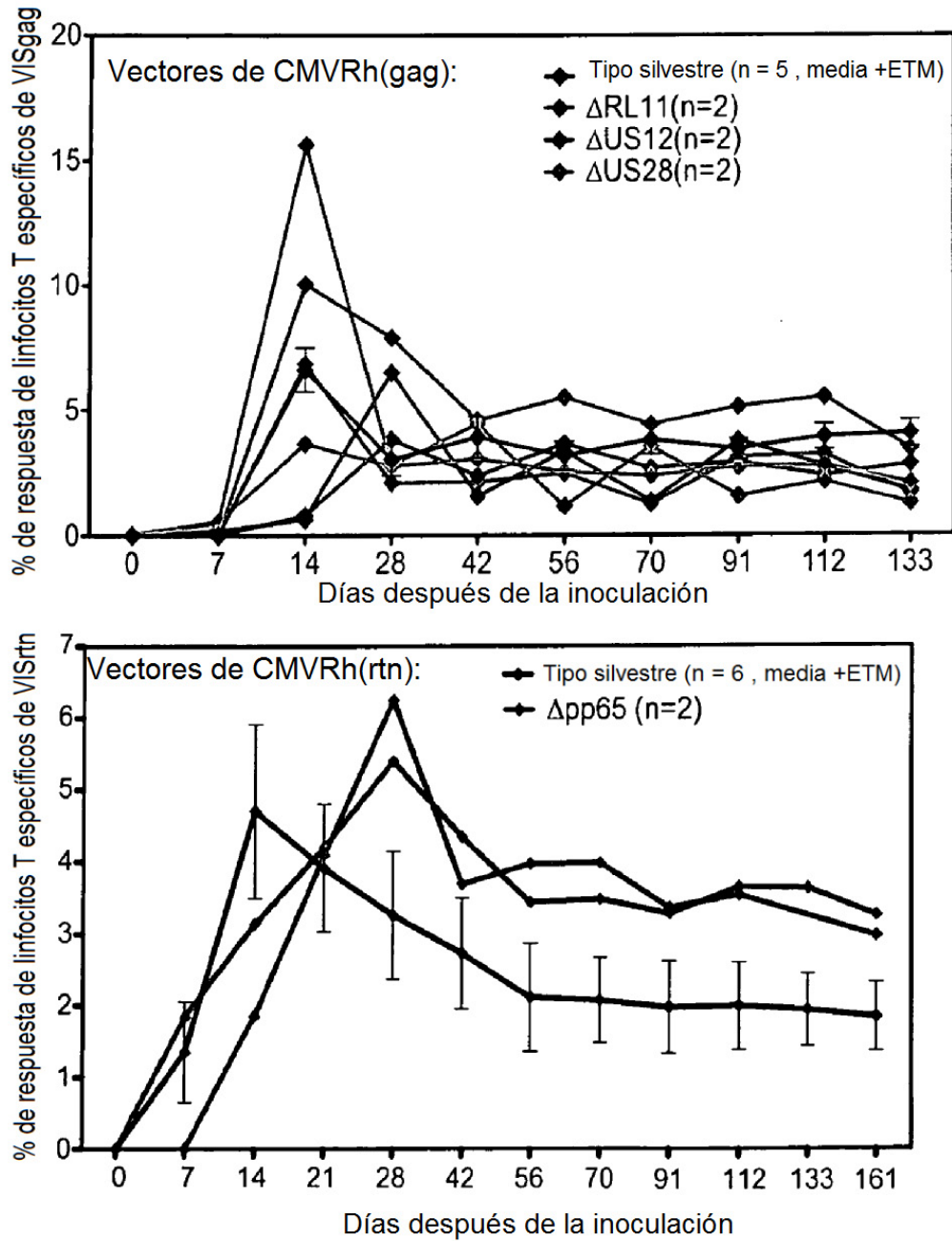


FIG. 35

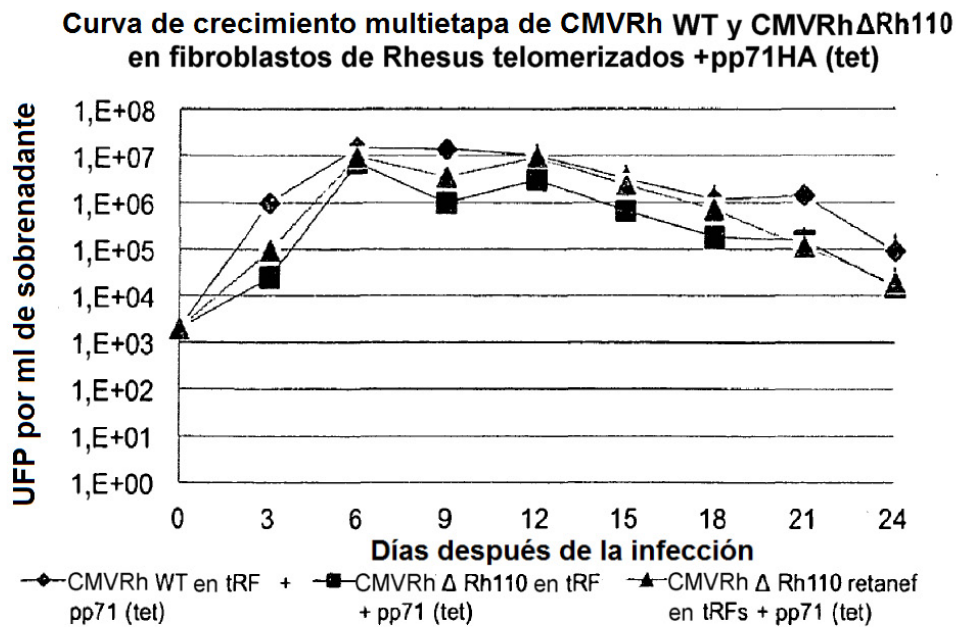
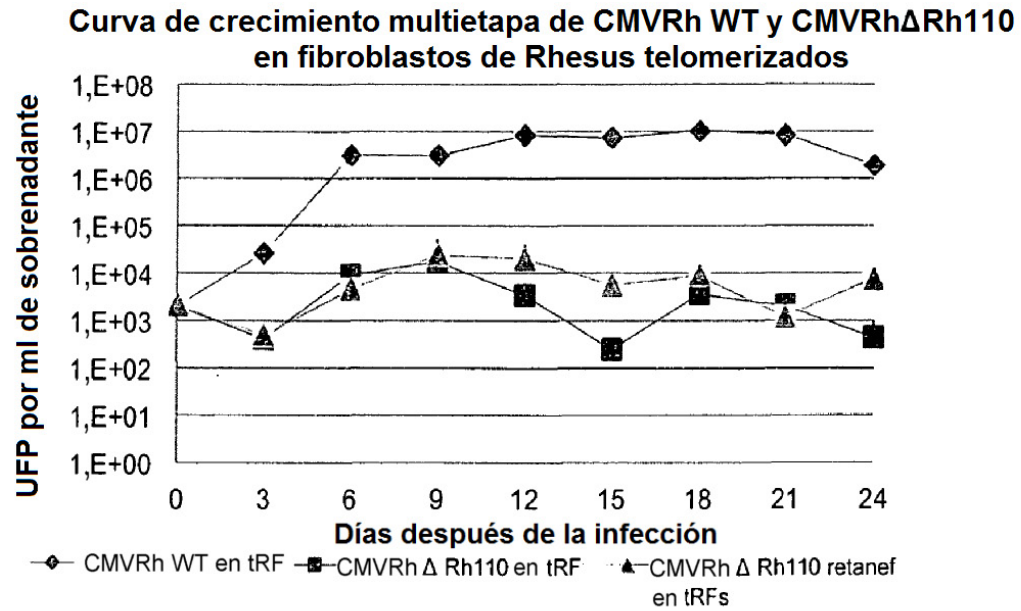


FIG. 36

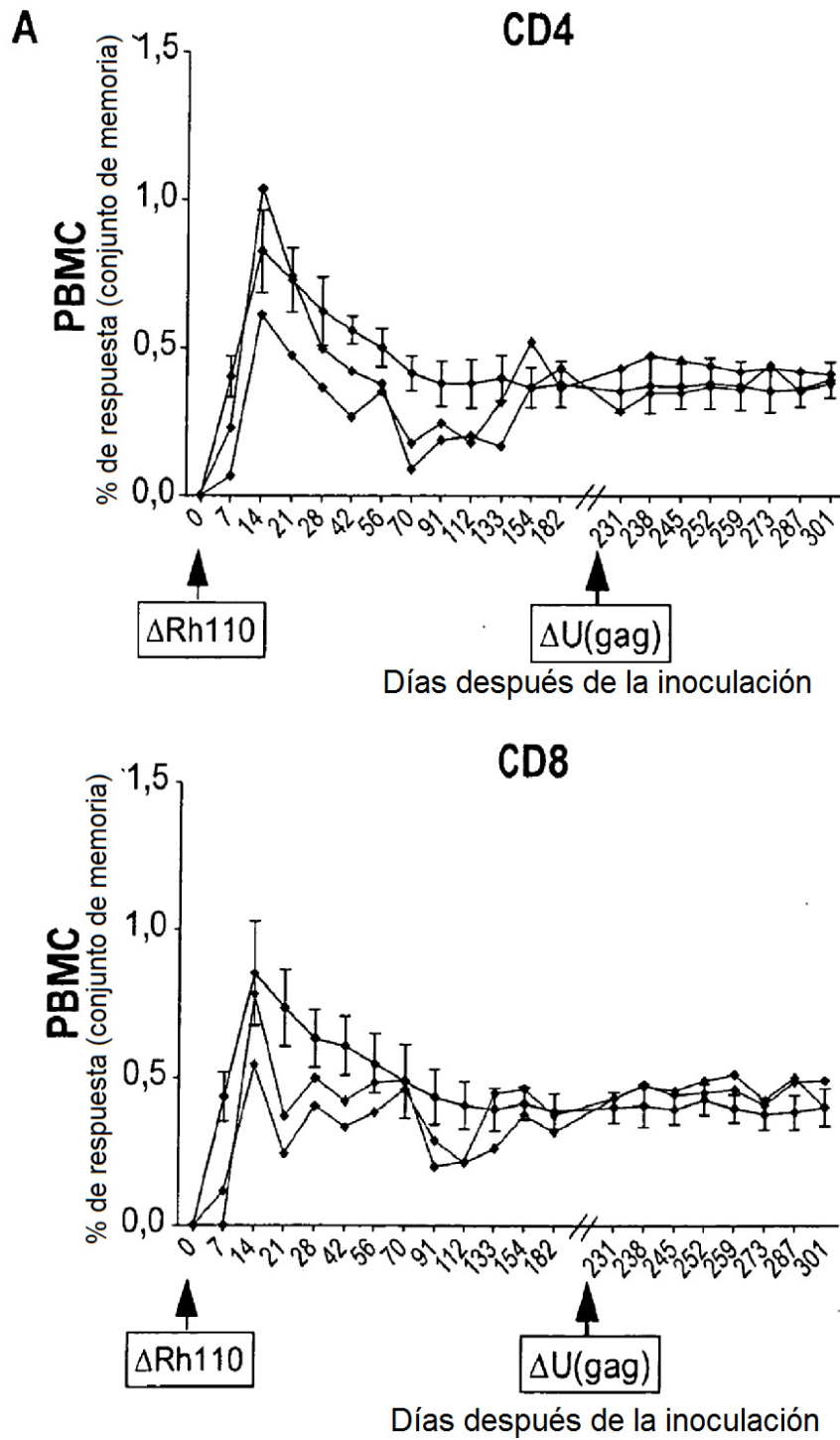


FIG. 37A

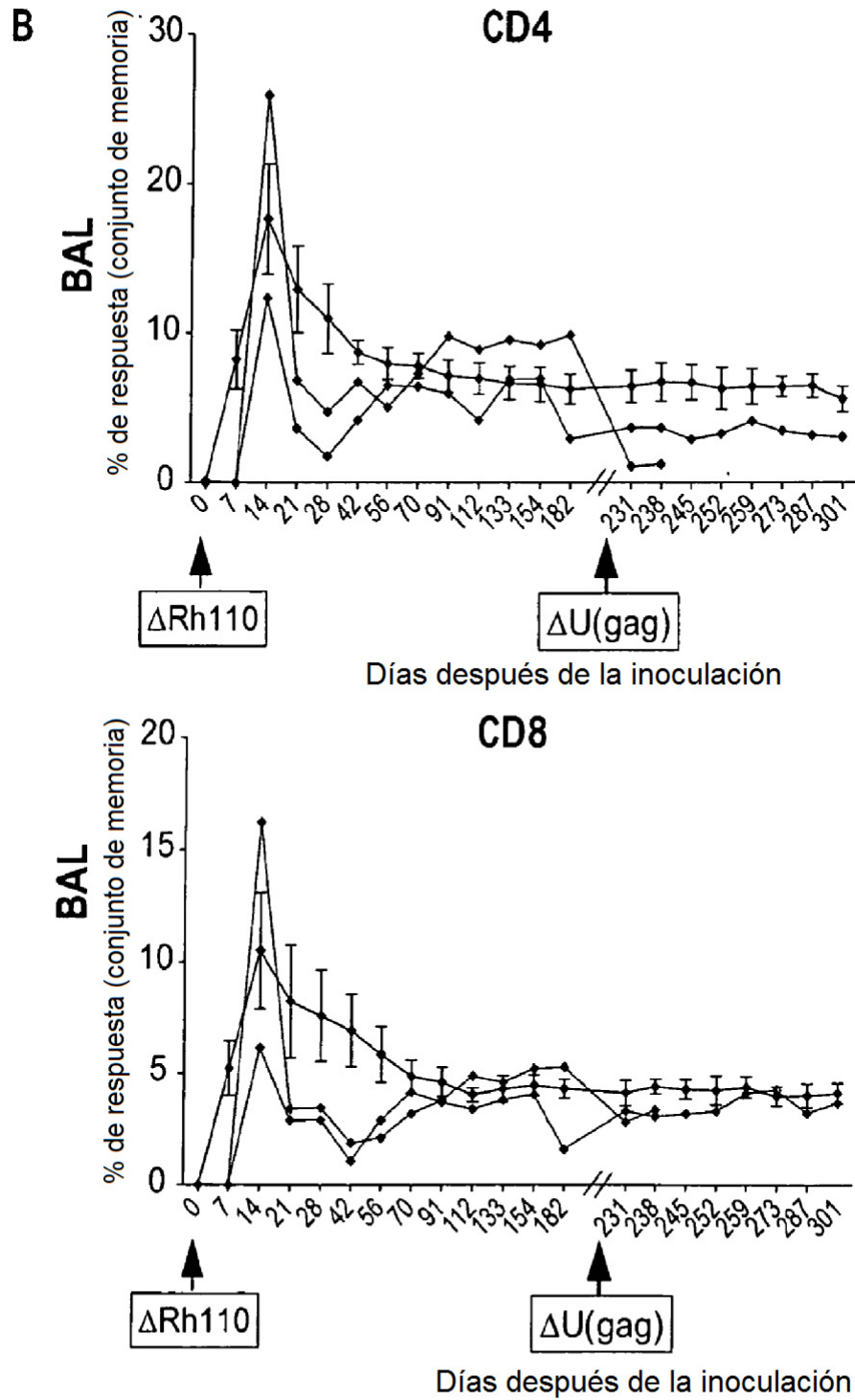


FIG. 37B

C

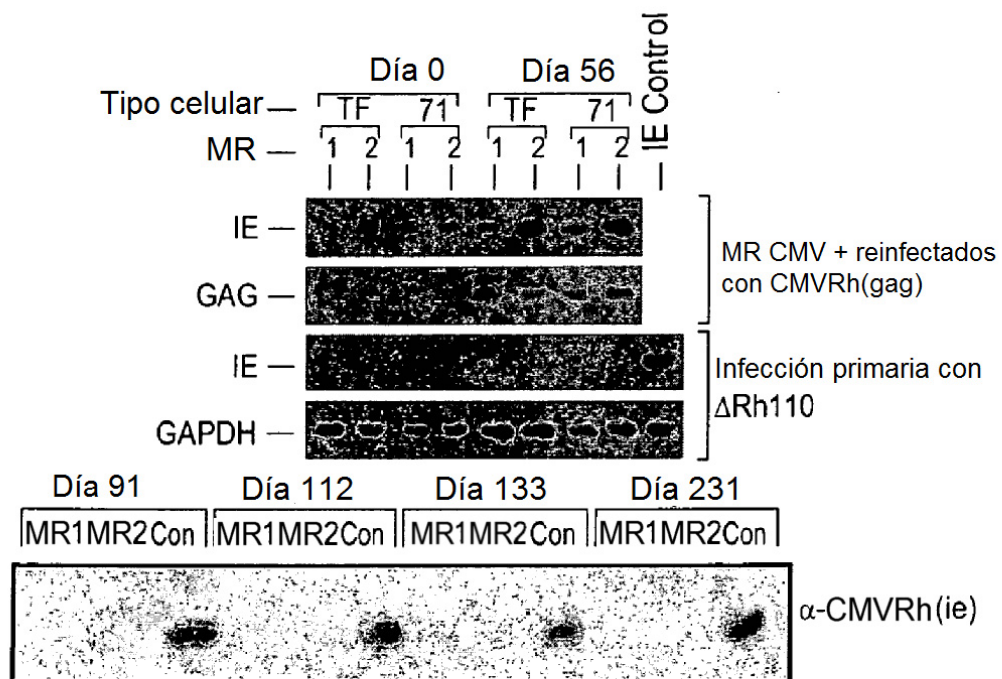


FIG. 37C

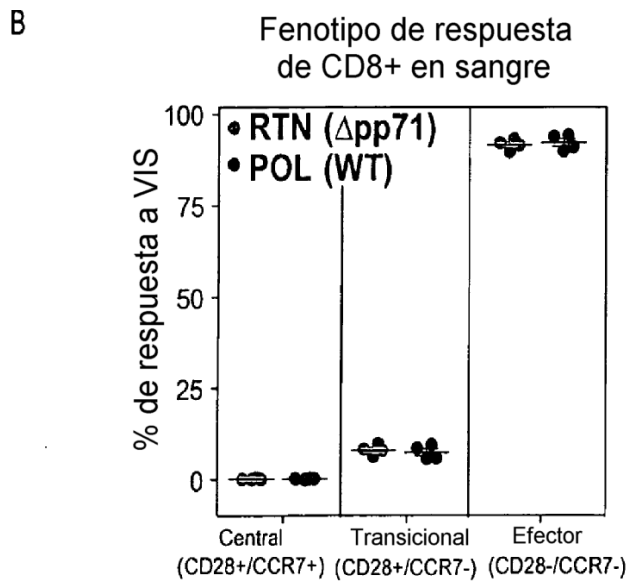
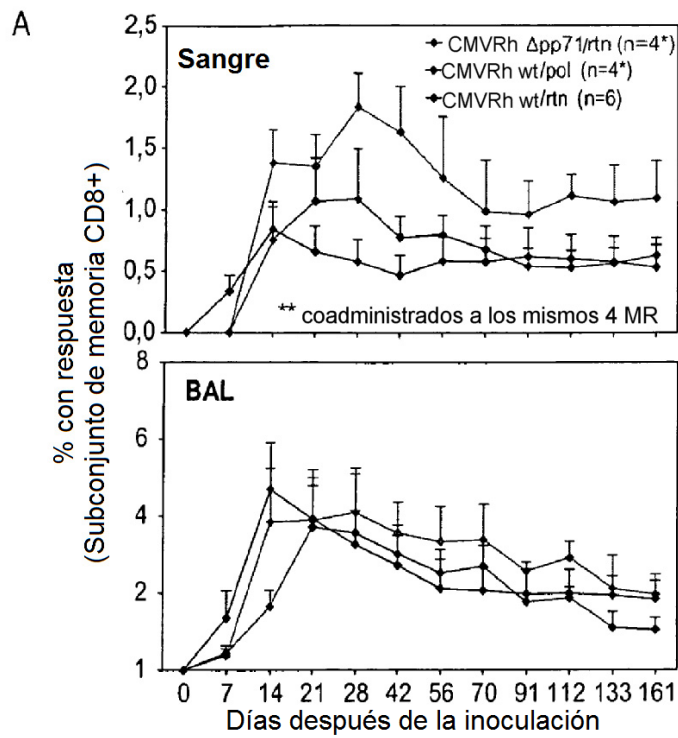


FIG. 38A-38B

C

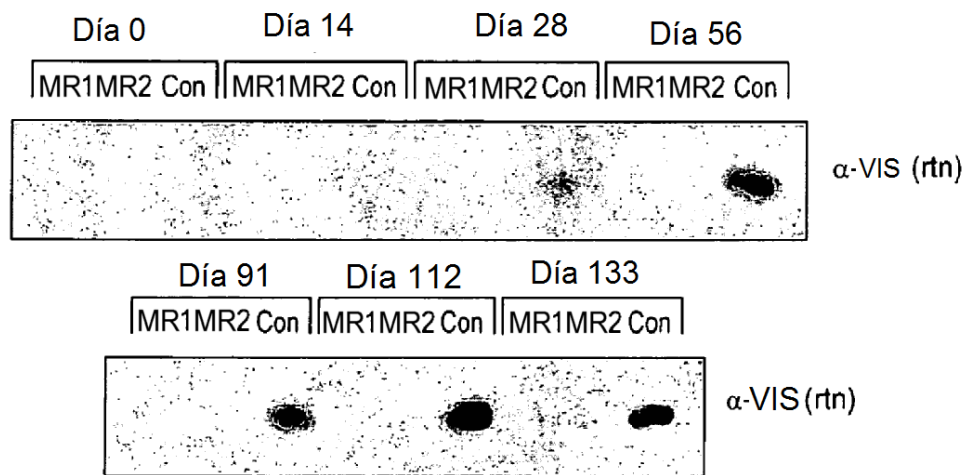
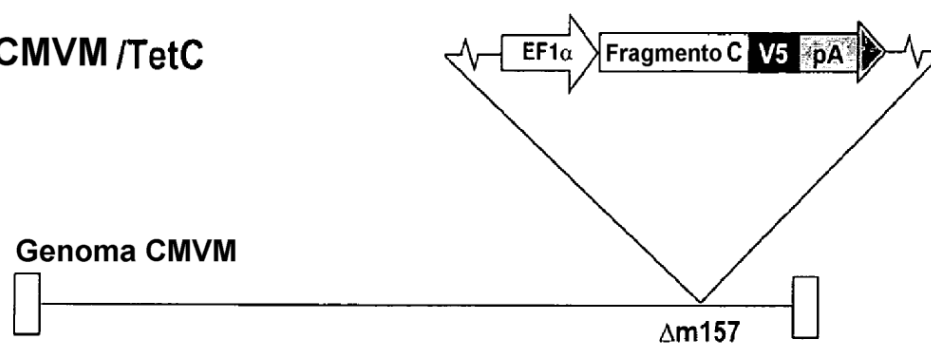


FIG. 38C

A.

CMVM /TetC



B.

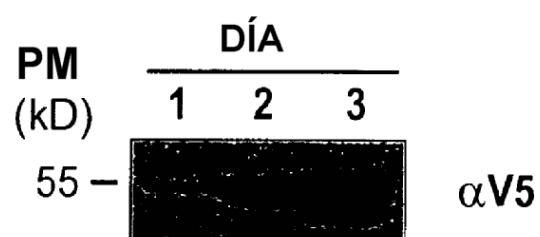


FIG. 39A-39B