

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 425**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/US2012/041475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170765**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12797634 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2691530**

54 Título: **Glucoproteínas y vectores recombinantes de CMV**

30 Prioridad:

10.06.2011 US 201161495552 P

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

10.05.2018

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
(25.0%)**

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

PICKER, LOUIS (25.0%);

FRUH, KLAUS (25.0%) y

FRUH, KLAUS (25.0%)

72 Inventor/es:

PICKER, LOUIS;

FRUH, KLAUS y

HANSEN, SCOTT

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 667 425 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

Glucoproteínas y vectores recombinantes de CMV

5 **Sector de la técnica**

Esta invención se refiere a vectores de citomegalovirus recombinantes, a procedimientos para prepararlos, a usos para ellos, a productos de expresión de ellos y a usos de los mismos. Esta invención también se refiere a las glucoproteínas US2 a US11 de citomegalovirus, en particular, a vectores de citomegalovirus recombinantes que carecen de una o más de las glucoproteínas US2 a US11, particularmente US8 a US11 y, más particularmente, US 11.

LEYENDA DE FINANCIACIÓN FEDERAL

15 Esta invención se financió en parte por el número de beca RO1 AI059457 de los Institutos Nacionales de la Salud. El Gobierno federal puede tener ciertos derechos sobre la invención.

Estado de la técnica

20 El CMVH es un virus ubicuo que está presente en más del 60% de la población dependiendo del nivel socioeconómico. Después de la infección primaria, el CMVH persiste durante toda la vida del hospedador. Aunque el CMVH es habitualmente benigno en individuos sanos, el virus puede causar una enfermedad devastadora en poblaciones inmunocomprometidas que da como resultado una alta morbilidad y mortalidad (para revisión, véase (Pass, R. F. 2001. Cytomegalovirus, págs. 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 edición, Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia).

30 El CMV es uno de los virus más inmunogénicos conocidos. Títulos de anticuerpo elevados se dirigen contra numerosas proteínas víricas durante la infección primaria de individuos sanos (Alberola, J et al., J Clin Virol 16, 113-122 (2000); Rasmussen L et al., J Infect Dis 164, 835-842 (1991); y (Farrell HE and Shellam GR, J Gen Virol 70 2573-2586 (1989). Además, una gran proporción del repertorio de linfocitos T del hospedador también se dirige contra antígenos de CMV, con frecuencias medianas de respuesta de linfocitos T CD4+, 5-10 veces más altas al CMVH que a los virus agudos (sarampión, paperas, gripe, adenovirus) o incluso otros virus persistentes como los virus herpes simple y varicela-zoster (Sylwester AW et al., J Exp Med 202, 673-685 (2005). También se observa comúnmente una elevada frecuencia de respuestas de CD8+ a epítomos o proteínas de CMVH definidos (Gillespie GM et al., J Virol 74, 8140-8150 (2000), Kern F et al., J Infect Dis 185, 1709-1716 (2002), Kern F et al., Eur J Immunol 29, 2908-2915 (1999), Kern F et al., J Virol 73, 8179-8184 (1999) y Sylwester AW et al., J Exp Med 202, 673-685 (2005). En un estudio humano a gran escala que cuantifica las respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ al genoma completo de CMVH, las frecuencias medias de los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de CMV superaron el 10% de la población de memoria tanto para subconjuntos como para algunos individuos, los linfocitos T específicos de CMV representaron > 25% del repertorio de linfocitos T de memoria.

45 Paradójicamente, la respuesta inmunitaria robusta a CMV es incapaz de erradicar el virus en individuos sanos infectados o de conferir protección contra la reinfección. Durante mucho tiempo, se ha creído que esta capacidad de CMV de escapar de la erradicación por el sistema inmunitario y de reinfectar al hospedador seropositivo está relacionada con los inmunomoduladores víricos múltiples codificados por el virus (para revisión, véase, Mocarski ES et al., Trends Microbiol 10, 332-339 (2002) incorporado por referencia en el presente documento.) La familia de proteínas US6 de CMVH (equivalente a los homólogos de RhCMV: Rh182-Rh189) es la más ampliamente estudiada de estos inmunomoduladores (Loenen WA et al., Semin Immunol 13, 41-9 (2001). Se sabe que al menos cuatro genes diferentes, US2, US3, US6 y US11 - y los respectivos homólogos de RhCMV (Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189) - interfieren con el ensamblaje y transporte de las moléculas del MHC I (Ahn K et al., Proc Natl Acad Sci U S A 93, 10990-10995 (1996), Ahn K et al., Immunity 6, 613-621 (1997).) Jones TR et al., J Virol 69, 4830-4841 (1995); Pande NT et al., J Virol 79, 5786-5798, (2005). Wiertz EJ et al., Cell 84, 769-779 (1996); y Wiertz EJ et al., Nature 384, 432-438 (1996).)

55 Cada una de estas cuatro moléculas interfiere en diferentes puntos esenciales de la maduración de la proteína MHC I. US2 se une a la cadena pesada del MHC I recién sintetizada (HC) y transloca de forma inversa la proteína a través del canal de translocación SEC61 de vuelta al citosol, donde HC se degrada por el proteosoma. De forma similar, US 11 expulsa MHC I de vuelta al interior del citoplasma. US3 y US6 actúan más tarde en el proceso de ensamblaje del MHC-I con US3 reteniendo heterotrímeros completamente formados en el RE previniendo, de este modo, su transporte a la superficie celular y US6 previniendo el transporte de péptidos por TAP y, de este modo, la formación del complejo trimérico de HC, β 2m y péptido.

65 Los vectores basados en CMV que expresan antígenos heterólogos no inducen linfocitos T citotóxicos dirigidos contra epítomos inmunodominantes de estos antígenos heterólogos. Esto limita la eficacia de los linfocitos T planteados por una vacuna basada en CMV para proteger contra la infección por un patógeno o para desencadenar

una respuesta inmunitaria celular contra un tumor.

5 Sin embargo, vectores basados en CMV que carecen de inhibidores virales de la presentación de antígenos por moléculas MHC de clase I - vectores basados en CMV que tienen mutaciones perjudiciales (incluyendo delección) en todos los vectores de US2, US3, US6, US8, US10 y US11 (vectores Δ US2-11) inducen, de hecho, a los linfocitos T a responder a antígenos inmunodominantes. (Hansen SG et al., Science 328, 102-106 (2010). Sin embargo, el tipo salvaje de US2, US3, US6, US8, US10 y US11 confieren superinfectividad en vectores de CMV de tipo salvaje. Por lo tanto, los vectores que tienen mutaciones perjudiciales en todos los US2, US3, US6, US8, US 10 y US 11 son eliminados por linfocitos T CD8+ citotóxicos en individuos previamente inoculados con vectores de CMV o infectados de manera natural con CMV. Debido a que la inmensa mayoría de los seres humanos han estado expuestos a CMV en algún momento de sus vidas, los vectores basados en CMV que tiene mutaciones perjudiciales en todos los US2, US3, US6, US8, US10 y US11 serían de uso limitado.

15 Se pensó que la capacidad del CMV de tipo salvaje para superinfectar individuos inmunes a CMV y su incapacidad para inducir linfocitos T CD8+ citotóxicos para epítomos inmunodominantes de antígenos heterólogos estaban intrincadamente relacionadas. La inmunogenicidad de los vectores de CMV solo se mejoró a costa de perder la capacidad de superinfectar.

20 Existe la necesidad de vectores de CMV que puedan superinfectar individuos inmunes a CMV e inducir una respuesta inmunitaria, por ejemplo, linfocitos T CD8+ citotóxicos.

Objeto de la invención

25 La presente invención se refiere a vectores virales que superan una deficiencia crucial en el desarrollo de vacunas basadas en citomegalovirus (CMV).

30 La presente invención se refiere a vectores que pueden tener mutaciones (hasta e incluyendo delecciones completas) de los genes de US8, US 10 y US 11, pero que mantienen homólogos funcionales de US2, US3 y US6. Estos vectores pueden ser útiles en pacientes con inmunidad contra CMV previa y generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos a epítomos inmunodominantes de antígenos heterólogos.

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

35 La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, se puede entender mejor conjuntamente con los dibujos adjuntos.

40 La fig. 1 representa un conjunto de dos gráficos de líneas que compara el epítomo de linfocitos T CD8+ dirigido a respuestas específicas de SIVgag que surgen después de la vacunación de Mamu A*01 +, MR libres de CMV con vectores de ts frente a vectores knock-out para US2-11 (KO) RhCMV/gag. El vector US2-11 KO provoca respuestas a todos los epítomos de gag restringidos a Mamu A*01 previamente caracterizados, mientras que los vectores de CMV de ts provocan respuestas de linfocitos T CD8+ específicas de gag que no se dirigen a estos epítomos (gag = mezclas de gag 15meros en total).

45 La fig. 2 representa un gráfico que representa el reconocimiento de péptidos gag 15meros individuales, consecutivos por cada 3 Mamu A*01 +, MR libres de CMV vacunados con vectores de ts frente a vectores knock-out para US2-11 (KO) RhCMV/gag. Obsérvese que mientras que tanto los vectores ts como los KO provocan un amplio reconocimiento de epítomos de gag de linfocitos T CD8+, solo las respuestas inducidas por vector KO incluyen el reconocimiento de péptidos que contienen epítomos inmunodominantes convencionales (rectángulos amarillos; epítomos designados en la parte superior).

50 La fig. 3 representa la región US2-11 de RhCMV. Son inhibidores del MHC-I Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189. A continuación se muestran homólogos de CMV humanos.

55 Las figs. 4A-4B representan un diagrama de virus utilizados en el Ejemplo 2. Se muestran en detalle aquí, regiones del genoma que se alteraron para crear virus mutantes. Todos los ORF de RhCMV se representan como flechas que corresponden con la dirección del ORF dentro del genoma. Las flechas azules representan genes que regulan negativamente el MHC de clase I. La nomenclatura de RhCMV designada se usa para todos los ORF. Para los ORF con homología con los genes de CMVH, el nombre del correspondiente homólogo de CMVH se muestra entre paréntesis. También se representan los marcadores inmunológicos de SIV SIVgag y RTN y los sitios de recombinación LoxP, FRT y F5 FRT.

60 La fig.5 representa la caracterización de RhCMV recombinantes por RT-PCR. Se infectaron fibroblastos a MOI=1 con el virus indicado y se recolectó el ARN total a las 24hpi (Δ 6-9gag = Δ US8-11gag). Se sintetizó ADNC mediante cebado de hexámeros aleatorios y los transcritos se amplificaron con cebadores específicos para los ORF indicados a la izquierda. Se incluyeron genes que flanqueaban las regiones delecionadas para detectar posibles cambios en la transcripción debidos a las delecciones. WT= RhCMV de tipo salvaje derivado de cromosoma artificial bacteriano (BAC). RT= transcriptasa inversa.

65 La fig. 5B representa la expresión de SIVgag y SIV RTN por virus recombinantes. El análisis de

inmunotransferencia de SIVgag marcado con FLAG y SIV RTN marcado con V5 se realizó en los tiempos indicados después de que los fibroblastos se infectaran a MOI=1 y se recolectara el lisado total.

La fig. 6A representa la respuesta reforzada de linfocitos T CD4+ específicos de RhCMV en PBMC y BAL. El refuerzo de las respuestas de linfocitos T anti-CMV preexistentes es un signo de superinfección por el vector entrante.

La fig. 6B representa el desarrollo de la respuesta total de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de SIV-gag en PBMC y BAL. El desarrollo de una respuesta SIVgag de novo es una prueba de superinfección.

La fig. 6C representa el desarrollo de la respuesta de linfocitos T CD8+ en PBMC a péptidos derivados de SIV-gag específicos que se conocen como epítomos restringidos a Mamu A*01. El desarrollo de respuestas de linfocitos T frente a epítomos inmunodominantes contrasta con la falta de estas respuestas tras la superinfección RhCMV de tipo salvaje que expresa gag (fig. 1).

La fig. 7A es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de células en la sangre (izquierda) y en BAL (derecha) que responde a SIVrt_n y SIVgag en MR inoculados con vectores ΔUS8-11RhCMV/rt y ΔUS8-11RhCMV/gag a lo largo del tiempo después de la inoculación.

La fig. 7A es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de células en la sangre (izquierda) y en BAL (derecha) que responde a los epítomos restringidos a Mamu A*01 inmunodominantes SIVtat(SL8) y SIVgag(CM9), determinado por análisis de citometría de flujo en MR inoculados con vectores ΔUS8-11RhCMV/rt y ΔUS8-11RhCMV/gag con el tiempo después de la inoculación.

La fig. 8A es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de células en la sangre (izquierda) y BAL (derecha) que responde a SIVrt_n y SIVgag en MR inoculados con vectores ΔUS2-6RhCMV/rt_n y ΔUS2-6RhCMV/gag con el tiempo después de la inoculación.

La fig. 8B es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de células en la sangre (izquierda) y en BAL (derecha) que responde a los epítomos restringidos a Mamu A*01 inmunodominantes SIVtat(SL8) y SIVgag(CM9), determinado por análisis de citometría de flujo en MR inoculados con vectores ΔUS2-6RhCMV/rt_n y ΔUS2-6RhCMV/gag con el tiempo después de la inoculación. No se detectaron células de respuesta.

La fig. 9A es una representación esquemática de la construcción RTNΔ189gag.

La fig. 9B es una imagen de un gel que muestra los resultados de amplificación por PCR de las construcciones de la fig. 9A que verifica la delección de Rh189 y la inserción de SIVgag.

La fig. 9C es una imagen de una prueba de inmunotransferencia para SIVretanef en las construcciones indicadas.

La fig. 10 es un diagrama de flujo de células que responden a RTN y su péptido inmunodominante SL8-tat en un macaco rhesus inoculado con RhCMV/RTNΔ189gag, que muestra que una mutación perjudicial en US 11 por sí sola es suficiente para conferir superinfectividad y para la presentación de epítomos inmunodominantes.

35 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un vector de CMV capaz de infectar a un organismo de manera repetida que puede comprender una mutación deletérea en la glucoproteína US 11 de tal carácter que la mutación hace que la glucoproteína particular no funcione o causa una reducción en la función. La mutación puede ser cualquier mutación, incluyendo una mutación puntual, una mutación con desplazamiento del marco de lectura y una delección de menos de toda la glucoproteína, la delección de la glucoproteína completa, o la delección de la secuencia de ácido nucleico que abarca todas las US8, US10 y US11 y todas las secuencias intermedias. En ejemplos adicionales, el vector de CMV puede comprender una mutación deletérea en US 11, hasta e incluyendo la delección de todos los ORF de US 11.

Por ejemplo, Las figuras 6A, 6B y 6C muestran que un vector viral con una delección de US8-11 es todavía capaz de la superinfección de animales positivos para CMV y que CMV que carece de US8-11 induce una respuesta de linfocitos T a los epítomos de SIV inmunodominantes. Se inocularon dos macacos rhesus positivos para CMV (MR) (n.º 26597 y n.º 27198 por vía subcutánea con 10⁷ UFP de ΔUS8-11gag recombinante. Se determinaron las frecuencias de las respuestas por análisis de citometría de flujo de tinción de citoquinas intracelulares para CD69, TNF-α e interferón-γ usando RhCMV o péptidos 15meros solapantes correspondientes a SIVgag. Se muestra el porcentaje de linfocitos T específicos de SIVgag que responden dentro del subconjunto total de memoria para cada punto de tiempo. Se midieron las respuestas específicas de RhCMV añadiendo virus purificados.

Las mutaciones pueden ser aleatorias o dirigidas. Para las mutaciones aleatorias, los agentes mutagénicos, en particular los agentes mutagénicos alquilantes, son sulfato de dietilo (des), etilenimina (ei), propano sulfona, N-metil-N-nitrosouretano (mnu), N-nitroso-N-metilurea (NMU), N-etil-N-nitrosourea (enu), se puede utilizar azida sódica. Como alternativa, las mutaciones se pueden inducir por medio de irradiación, que se selecciona, por ejemplo, de rayos x, neutrones rápidos, irradiación UV.

Las mutaciones se pueden introducir utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados. Un método adecuado se divulga en Morinaga et al. (Biotechnology (1984)2, págs. 646-649). Otro método de introducción de mutaciones en secuencias de nucleótidos que codifican enzimas se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, págs. 147-151). En lugar de mutagénesis dirigida, tal como se describe anteriormente, se pueden introducir mutaciones de manera aleatoria, por ejemplo, usando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de

Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria por PCR Diversify de Clontech. El documento EP 0 583 265 se refiere a métodos para optimizar la mutagénesis basada en PCR, que también se puede combinar con el uso de análogos de ADN mutagénicos tales como los descritos en el documento EP 0 866 796. Las tecnologías de PCR propensas a errores son adecuadas para la producción de variantes de lípido acil transferasas con características preferidas.

5 Se conocen técnicas antisentido así como manipulación directa de genes para su uso en la modulación de la expresión génica. La invención además incluye el uso de ácidos nucleicos no codificantes, que pueden incorporar nucleótidos naturales o modificados, o ambos, ribozimas, incluyendo ribozimas cabeza de martillo, inactivación génica, tal como por recombinación homóloga, y otras técnicas para reducir los niveles de expresión génica.

10 La interferencia del ARN (ARNi) es un método postranscripcional de silenciamiento génico (PTGS) inducido por la introducción directa de ARN bicatenario (ARNbc) y ha surgido como una herramienta útil para eliminar la expresión de genes específicos en una variedad de organismos. Se describe el ARNi por Fire et al., Nature 391:806-811 (1998). Se conocen otros métodos de PTGS e incluyen, por ejemplo, introducción de un transgén o virus. En general, en PTGS, el transcrito del gen silenciado se sintetiza pero no se acumula porque se degrada rápidamente. Se describen métodos para PTGS, incluyendo ARNi, por ejemplo, en el sitio web Ambion.com, en el directorio "/hottopics/", en el fichero "rna". Los expertos en la materia conocen métodos adecuados para ARNi *in vitro*. Uno de estos métodos implica la introducción de ARNi (ARN de interferencia pequeño). Los modelos actuales indican que esos ARNbc de 21-23 nucleótidos pueden inducir PTGS. Se describen métodos para diseñar ARNi eficaces, por ejemplo, en el sitio web de Ambion descrito anteriormente.

25 Los vectores de CMV, cuando se usan como vectores de expresión, son no patógenos de manera innata en los sujetos seleccionados tales como seres humanos o se han modificado para hacerlos no patógenos en los sujetos seleccionados. Por ejemplo, los adenovirus y los alfavirus defectuosos para la replicación son bien conocidos y se pueden usar como vectores de administración génica. Sin US2-11, todos estos vectores (excepto CMV que contiene US2-11 de manera natural) provocan una inmunidad específica de vector que prohíbe su uso repetido.

30 La presente invención también se refiere a un método para inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ en un sujeto, que puede comprender (a) administrar un vector de CMV con, al menos, una glicoproteína de citomegalovirus (CMV) eliminada del vector de CMV, donde la glucoproteína es US 11 y donde el vector de CMV contiene y expresa, al menos, un antígeno heterólogo (no CMV) y (b) administrar el vector al sujeto animal o humano.

35 El antígeno heterólogo puede derivar de un patógeno. El patógeno puede ser un patógeno viral y el antígeno puede ser una proteína derivada del patógeno viral. Los virus incluyen, pero sin limitación, Adenovirus, virus coxsackie, virus de la hepatitis A, poliovirus, rinovirus, herpes simple, tipo 1, herpes simple, tipo 2, virus Varicela zóster, virus de Epstein-Barr, herpesvirus de sarcoma de Kaposi, citomegalovirus humano, herpesvirus humano, tipo 8, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la parainfluenza, virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano, virus del papiloma humano, virus de la rabia, virus de la rubeola, bocavirus humano y parvovirus B19.

45 El patógeno puede ser un patógeno bacteriano y el antígeno puede ser una proteína derivada del patógeno bacteriano. Las bacterias patógenas incluyen, pero sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholera* y *Yersinia pestis*.

55 El patógeno puede ser un parásito y el antígeno puede ser una proteína derivada del parásito patógeno. El parásito puede ser un organismo protozoario o una enfermedad causada por un organismo protozoario tal como, pero sin limitación, Acanthameba, Babesiosis, Balantidiasis, Blastocistosis, Coccidia, Dientamebiasis, Amebiasis, Giardia, Isosporiasis, Leishmaniasis, Meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), Malaria, Rinosporidiosis, Toxoplasmosis - Neumonía parasitaria, Tricomoniasis, Enfermedad del sueño y Enfermedad de Chagas. El parásito puede ser un organismo helminto o un gusano o una enfermedad causada por un organismo helminto tal como, pero sin limitación, Anquilostomiasis/Anquilostomas, Anisakiasis, Lombrices intestinales - Neumonía parasitaria, Lombrices intestinales - Baylisascariasis, Tenia - Infección por tenia, Clonorchiasis, Infección por *Diocotylus renalis*, Difilobotriasis - tenia, Gusano de Guinea - Dracunculiasis, Equinococcosis - tenia, Lombriz intestinal - Enterobiasis, Duela hepática - Fasciolosis, Fasciolopsiasis - duela intestinal, Gnatostomiasis, Himenolepiasis, Loa loa filariasis, Hinchazón de Calabar, Mansoneliasis, Filariasis, Metagonimiasis - duela intestinal, Oncocercosis, Duela hepática china, Paragonimiasis, Duela de pulmón, Esquistosomiasis - bilharzia, Duela de caracol (todos los tipos), Esquistosomiasis intestinal, Esquistomatosis urinaria, Esquistomatosis por Esquistosoma japonés, Esquistosomiasis

intestinal Asiática, Esparganosis, Estrongiloidiasis - Neumonía parasitaria, Tenia de vaca, Tenia de cerdo, Toxocariasis, Triquinosis, Picadura de notonéctido, Tricocéfalos y Elefantiasis por filariasis linfática. El parásito puede ser un organismo o una enfermedad causada por un organismo tal como, pero sin limitación, lombrices parasitarias, Síndrome de Halzoun, Miasis, Pulga de Chigoe, Moscardón humano y Candiru. El parásito puede ser un ectoparásito o una enfermedad causada por un ectoparásito tal como, pero sin limitación, Ácaro, Piojo de la cabeza - Pediculosis, Piojo del cuerpo - Pediculosis, Piojo púbico - Pediculosis, Demodex - Demodicosis, Sarna, Gusano barrenador y Cochliomyia.

El antígeno puede ser una proteína derivada de cáncer. Los cánceres, incluyen, pero sin limitación, Leucemia linfoblástica aguda; Leucemia mieloide aguda; Carcinoma adrenocortical; Cánceres relacionados con SIDA; Linfoma relacionado con SIDA; Cáncer de ano; Cáncer del apéndice; Astrocitoma, cáncer cerebelar o cerebral de la infancia; Carcinoma de células basales; Cáncer del conducto biliar, extrahepático; Cáncer de vejiga; Cáncer óseo, 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 vía óptica e hipotalámico; Cáncer de mama; Adenomas bronquiales/carcinoides; Linfoma de Burkitt; Tumores carcinoides, de la infancia; Tumores carcinoides, gastrointestinales; Carcinoma de sitio primario desconocido; Linfoma del sistema nervioso central, primario; Astrocitoma cerebeloso, de la infancia; Astrocitoma cerebral/Glioma maligno, de la infancia; Cáncer de cuello uterino; Cánceres de la infancia; Leucemia linfocítica crónica; Leucemia mielógena crónica; Trastornos crónicos mieloproliferativos; Cáncer de colon; Linfoma cutáneo de linfocitos T; Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; Cáncer de endometrio; Ependimoma; Cáncer de esófago; Sarcoma de Ewing en la familia de tumores Ewing; Tumor de células germinales extracraneales, de la infancia; Tumor de células germinales extragonadales; Cáncer del conducto biliar extrahepático; Cáncer ocular, Melanoma intraocular; Cáncer ocular, Retinoblastoma; Cáncer de vesícula biliar; Cáncer gástrico (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, Vía óptica infantil e hipotalámica; Carcinoide gástrico; Leucemia de células pilosas; Cáncer de cabeza y cuello; Cáncer cardíaco; Cáncer hepatocelular (hígado); Linfoma de Hodgkin; Cáncer hipofaríngeo; Glioma hipotalámico y de la vía óptica, de la infancia; Melanoma intraocular; Carcinoma de células de islote (páncreas); Sarcoma de Kaposi; Cáncer renal (cáncer de células renales); Cáncer de laringe; Leucemias; Leucemia, linfoblástica aguda (también llamada leucemia linfocítica aguda); Leucemia, mieloide aguda (también llamada leucemia mielógena aguda); Leucemia, linfocítica crónica (también llamada leucemia linfocítica crónica); Leucemia, mielógena crónica (también llamada leucemia mieloide crónica); Leucemia, células pilosas; Cáncer de labio y de la cavidad oral; Cáncer de hígado (Primario); Cáncer de pulmón, No microcítico; Cáncer de pulmón, Microcítico; Linfomas; Linfoma, relacionado con SIDA; Linfoma, Burkitt; Linfoma, cutáneo de linfocitos T; Linfoma, Hodgkin; Linfomas, No-Hodgkinianos (una antigua clasificación de todos los linfomas excepto los de Hodgkin); Linfoma, Primario del sistema nervioso central; Marcus Whittle, Enfermedad mortal; Macroglobulinemia, Waldenström; Histiocitoma fibroso maligno de hueso/Osteosarcoma; Meduloblastoma, de la infancia; Melanoma; Melanoma, Intraocular (ojo); Carcinoma de células de Merkel; Mesotelioma, Maligno del Adulto; Mesotelioma, de la infancia; Cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto; Cáncer de boca; Síndrome de neoplasia endocrina múltiple, de la infancia; Mieloma múltiple/Neoplasia de células plasmáticas; Micosis fungoides; Síndromes mielodisplásicos; Enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; Leucemia mielógena, Crónicas; Leucemia mieloide, Aguda del Adulto; Leucemia mieloide, aguda de la infancia; Mieloma, Múltiple (cáncer de Médula Ósea); Trastornos mieloproliferativos, Crónicos; Cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal; Carcinoma nasofaríngeo; Neuroblastoma; Linfoma no hodgkiniano; Cáncer no microcítico de pulmón; Cáncer oral; Cáncer orofaríngeo; Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; Cáncer de ovarios; Cáncer epitelial de ovarios (Tumor epitelial superficial-estromal); Tumor de células germinales ováricas; Tumor ovárico de bajo potencial maligno; Cáncer de páncreas; Cáncer de páncreas, célula de los islotes; Cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal; Cáncer paratiroideo; Cáncer de pene; Cáncer faríngeo; Feocromocitoma; Astrocitoma pineal; Germinoma pineal; Pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, de la infancia; Adenoma pituitario; Neoplasia de células plasmáticas/Mieloma múltiple; Blastoma pleuropulmonar; Linfoma primario del sistema nervioso central; Cáncer de próstata; Cáncer de recto; Carcinoma de células renales (cáncer de riñón); Cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter; Retinoblastoma; Rabdomyosarcoma, de la infancia; Cáncer de las glándulas salivales; Sarcoma, Familia de tumores de Ewing; Sarcoma, Kaposi; Sarcoma, tejidos blandos; Sarcoma, uterino; Síndrome de Sézary; Cáncer de piel (no melanoma); Cáncer de piel (melanoma); Carcinoma de piel, células de Merkel; Cáncer microcítico de pulmón; Cáncer del intestino delgado; Sarcoma de tejidos blandos; Carcinoma de células escamosas - véase Cáncer de piel (no melanoma); Cáncer escamoso de cuello con primario oculto, metastásico; Cáncer de estómago; Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, de la infancia; Linfoma de linfocitos T, cutáneo (Micosis fungoides y síndrome de Sézary); Cáncer de testículos; Cáncer de 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 de, adulto; Carcinoma de sitio primario desconocido, de la infancia; Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; Cáncer de la uretra; Cáncer de útero, Cáncer de endometrio; Sarcoma uterino; Cáncer de vagina; Glioma de la vía óptica e hipotalámico, de la infancia; Cáncer de vulva; Macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms (cáncer de riñón).

Por consiguiente, la invención proporciona un CMV modificado sintéticamente para contener ADN exógeno. El CMV ha eliminado US 11 del mismo.

5 La invención, además, proporciona un vector para la clonación o para la expresión de ADN heterólogo que puede comprender el CMV recombinante.

El ADN heterólogo puede codificar un producto de expresión que puede comprender: un epítipo de interés, un modulador de respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión.

10 Un epítipo de interés es un antígeno o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de un patógeno o toxina de interés veterinario o humano.

15 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 provoca una respuesta con respecto al patógeno, o de otro antígeno o toxina que provoca una respuesta con respecto al patógeno.

20 Un epítipo de interés puede ser un antígeno de un patógeno o toxina humanos, o de un antígeno de un patógeno o toxina humanos, u otro antígeno o toxina que provoca una respuesta con respecto al patógeno, o de otro antígeno o toxina que provoca una respuesta con respecto al patógeno, tal como, por ejemplo: un antígeno de Morbillivirus, por ejemplo, un antígeno del virus del sarampión tal como HA o F; una glucoproteína de la rabia, por ejemplo, glucoproteína G del virus de la rabia; un antígeno de la gripe, por ejemplo, virus de la gripe HA o N; un antígeno de Herpesvirus, por ejemplo, una glucoproteína de un virus herpes simple (HSV), un citomegalovirus humano (CMVH), Epstein-Barr; un antígeno de flavivirus, un JEV, antígenos del virus de la fiebre amarilla o de virus del dengue; un antígenos del virus de la Hepatitis, por ejemplo, HBsAg; un antígeno del virus de la inmunodeficiencia, por ejemplo, un antígeno del VIH tal como gp120, gp160; un antígeno del virus Hantaan; un antígeno de C. tetani; un antígeno de las paperas; un antígeno neumocócico, por ejemplo, PspA; un antígeno de Borrelia, por ejemplo, OspA, OspB, OspC de Borrelia asociados con la enfermedad de Lyme tal como Borrelia burgdorferi, Borrelia atzelli y Borrelia garinii; un antígeno de la varicela (varicella zoster); o un antígeno de un Plasmodium.

30 El epítipo de interés puede derivar de un antígeno de un virus de inmunodeficiencia tal como VIH o SIV. Sin embargo, el epítipo de interés puede ser un antígeno de cualquier patógeno veterinario o humano o de cualquier antígeno de cualquier patógeno veterinario o humano.

35 Dado que el ADN heterólogo puede codificar un factor de crecimiento o gen terapéutico, el CMV recombinante puede usarse en terapia génica. La terapia génica implica la transferencia de información genética; y, con respecto a la terapia génica e inmunoterapia, se hace referencia a la Patente de los Estados Unidos n.º 5.252.479, junto con los documentos citados en ella y en su portada y al documento WO 94/16716 y la solicitud de los Estados Unidos n.º 08/184.009, presentada el miércoles, 19 de enero de 1994, junto con los documentos allí citados. El factor de crecimiento o gen terapéutico, por ejemplo, puede codificar una proteína que combate enfermedades, una molécula para tratar cáncer, un supresor tumoral, una citoquina, un antígeno asociado a un tumor o interferón; y, el factor de crecimiento o gen terapéutico puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en un gen que codifica alfa globina, beta globina, gamma globina, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de necrosis tumoral, una interleucina, factor estimulador de colonias de macrófagos, factor estimulador de colonias de granulocitos, eritropoyetina, factor de crecimiento de mastocitos, supresor tumoral p53, retinoblastoma, interferón, antígeno asociado al melanoma o B7.

50 La invención proporciona además una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que contiene el virus o vector de CMV recombinante y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una composición inmunológica que contiene el virus o vector de CMV recombinante (o un producto de expresión del mismo) provoca una respuesta inmunológica local o sistémica. La respuesta puede ser, pero no necesariamente, protectora. Una composición inmunogénica que contiene el virus o vector de CMV recombinante (o un producto de expresión del mismo) provoca de forma similar una respuesta inmunológica local o sistémica que puede ser, pero no necesariamente, protectora. Una composición de vacuna provoca una respuesta protectora local o sistémica. Por consiguiente, las expresiones "composición inmunológica" y "composición inmunogénica" incluyen una "composición de vacuna" (ya que las dos expresiones anteriores pueden ser composiciones protectoras).

60 La invención, por lo tanto, también proporciona un método para inducir una respuesta inmunológica en un hospedador vertebrado que puede comprender administrar al hospedador una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que puede comprender el virus o vector de CMV recombinante y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para los fines de la presente memoria descriptiva, el término "sujeto" incluye todos los animales y seres humanos, mientras que "animal" incluye todas las especies de vertebrados, excepto seres humanos; y "vertebrados" incluye todos los vertebrados, incluyendo animales (como se usa "animal" en el presente documento) y seres humanos. Y, por supuesto, un subconjunto de "animal" es "mamífero", que para los fines de la presente memoria descriptiva incluye todos los mamíferos, excepto los seres humanos.

65

La invención proporciona además una composición terapéutica que contiene el virus o vector de CMV recombinante y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica es útil en las realizaciones de terapia génica e inmunoterapia de la invención, por ejemplo, en un método para transferir información genética a un animal o ser humano que lo necesite, que puede comprender administrar al hospedador la composición; y, la invención, por consiguiente, incluye métodos para transferir información genética.

En otra realización más, la invención proporciona un método para expresar una proteína o producto génico o un producto de expresión que puede comprender infectar o transfectar una célula in vitro con un virus o vector de CMV recombinante de la invención y opcionalmente extraer, purificar o aislar la proteína, producto génico o producto de expresión o ADN de la célula. Y, la invención proporciona un método para clonar o replicar una secuencia de ADN heterólogo que puede comprender infectar o transfectar una célula in vitro o in vivo con un virus o vector de CMV recombinante de la invención y opcionalmente extraer, purificar o aislar el ADN de la célula o de la progenie vírica.

La invención proporciona en otro aspecto un método para preparar el virus o vector de CMV recombinante de la invención que puede comprender insertar el ADN exógeno en una región no esencial del genoma de CMV.

El método puede comprender además eliminar una región no esencial del genoma de CMV, preferentemente antes de insertar el ADN exógeno.

El método puede comprender recombinación in vivo. Por lo tanto, el método puede comprender transfectar una célula con ADN de CMV en un medio compatible con células en presencia de ADN donante que puede comprender el ADN exógeno flanqueado por secuencias de ADN homólogas con porciones del genoma de CMV, por lo que el ADN exógeno se introduce en el genoma del CMV y, opcionalmente, recuperar a continuación el CMV modificado por recombinación in vivo.

El método también puede comprender escindir ADN de CMV para obtener ADN de CMV escindido, ligar el ADN exógeno al ADN de CMV escindido para obtener ADN exógeno de CMV híbrido, transfectar una célula con el ADN exógeno de CMV híbrido y, opcionalmente, recuperar a continuación el CMV modificado por la presencia del ADN exógeno.

Dado que se comprende la recombinación in vivo, la invención, por consiguiente, proporciona también un plásmido que puede comprender ADN donante que no se produce de manera natural en CMV que codifica un polipéptido extraño a CMV, el ADN donante está dentro de un segmento de ADN de CMV que de otro modo sería colineal con una región no esencial del genoma de CMV de tal forma que el ADN de una región no esencial de CMV está flanqueando el ADN del donante.

El ADN exógeno se puede insertar en el CMV para generar el CMV recombinante en cualquier orientación que proporcione una integración estable de ese ADN y la expresión del mismo, cuando se desee.

El ADN exógeno en el virus o vector de CMV recombinante de la invención puede incluir un promotor. El promotor puede ser de un virus herpes. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor de citomegalovirus (CMV), tal como un promotor de CMV humano (CMVH) o de CMV murino. El promotor puede ser también un promotor no viral tal como el promotor EF1 α .

El promotor puede ser un promotor transcripcionalmente activo truncado que puede comprender una región transactivada con una proteína transactivadora proporcionada por el virus y la región promotora mínima del promotor de longitud completa a partir del cual deriva el promotor transcripcionalmente activo truncado. Para los fines de la presente memoria descriptiva, un "promotor" se compone de una asociación de secuencias de ADN que corresponden con el promotor mínimo y secuencias reguladoras cadena arriba; un "promotor mínimo" se compone del sitio CAP más la caja TATA (secuencias mínimas para el nivel básico de transcripción; nivel de transcripción no regulado); y, las "secuencias reguladoras cadena arriba" se componen del elemento o los elementos y secuencia(s) potenciadora(s) cadena arriba. Además, el término "truncado" indica que el promotor de longitud completa no está completamente presente, es decir, que se ha eliminado parte del promotor de longitud completa. Y, el promotor truncado puede derivar de un herpesvirus tal como MCMV o CMVH, por ejemplo, HCMV-IE o MCMV-IE.

A igual que el promotor anteriormente mencionado, el promotor de la invención puede ser un herpesvirus, por ejemplo, un MCMV o CMVH tal como promotor MCMV-IE o HCMV-IE; y, puede haber hasta un 40% e incluso hasta un 90% de reducción de tamaño, con respecto a un promotor de longitud completa, basándose en los pares de bases. El promotor también puede ser un promotor no viral modificado.

La invención también proporciona, de este modo, un casete de expresión para la inserción en un virus o plásmido recombinante que puede comprender el promotor transcripcionalmente activo truncado. El casete de expresión puede incluir además una señal de poliadenilación truncada funcional; por ejemplo, una señal de poliadenilación de SV40 que está truncada, aunque es funcional. Considerando que la naturaleza proporcionó una señal más grande, es realmente sorprendente que una señal de poliadenilación truncada sea funcional; y, una señal de poliadenilación truncada aborda los problemas de límite de tamaño de inserción de virus recombinantes tales como CMV. El casete

de expresión también puede incluir ADN exógeno o heterólogo con respecto al virus o sistema en el que se inserta; y ese ADN puede ser ADN exógeno o heterólogo como se describe en el presente documento.

En un aspecto más específico, la presente invención abarca CMV, recombinantes que pueden comprender promotores virales o no virales, preferentemente un promotor truncado de los mismos. La invención comprende además anticuerpos provocados por las composiciones de la invención y/o recombinantes y usos para tales anticuerpos. Los anticuerpos, o el producto (epítomos de interés) que los provocó, o anticuerpos monoclonales de los anticuerpos, se pueden usar en ensayos de unión, pruebas o kits para determinar la presencia o ausencia de un antígeno o anticuerpo.

El ADN flanqueante usado en la invención puede ser del sitio de inserción o de una parte del genoma adyacente al mismo (en el que "adyacente" incluye secuencias contiguas, por ejemplo, codón o codones, así como hasta tantas secuencias, por ejemplo, codón o codones, antes de que haya un sitio de inserción intermedio).

El ADN exógeno o heterólogo (o ADN extraño a CMV, o ADN que no se presenta de manera natural en CMV) puede ser ADN que codifica cualquiera de los epítomos de interés anteriormente mencionados, como se enumeran anteriormente. El ADN exógeno puede incluir un marcador, por ejemplo, un marcador de color o luz. El ADN exógeno también puede codificar un producto que sería perjudicial para un insecto hospedador de manera que el producto de expresión puede ser un pesticida o insecticida. El ADN exógeno también puede codificar un polipéptido antifúngico; y, para obtener información sobre dicho polipéptido y ADN para el mismo, se hace referencia a la patente de los Estados Unidos n.º 5.421.839 y los documentos citados en la misma.

El ADN heterólogo o exógeno en recombinantes de la invención preferentemente codifica un producto de expresión que puede comprender: un epítomo de interés, un modulador de respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión. Con respecto a estas expresiones, se hace referencia a la siguiente discusión, y en general a Kendrew, THE ENCYCLOPEDIA OF MOLECULAR BIOLOGY (Blackwell Science Ltd 1995) y Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL (segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

En cuanto a los antígenos para uso en vacunas o composiciones inmunológicas, véase también Stedman's Medical Dictionary (24ª edición, 1982), por ejemplo, definición de vacuna (para una lista de antígenos usados en formulaciones de vacunas; tales antígenos o epítomos de interés de esos antígenos pueden usarse en la invención, como un producto de expresión del virus recombinante de la invención, o en una composición multivalente que contiene un virus recombinante de la invención o un producto de expresión del mismo).

En cuanto a los epítomos de interés, un experto en la materia puede determinar un epítomo o región inmunodominante de un péptido o polipéptido y, por lo tanto, el ADN codificante para los mismos, a partir del conocimiento de las secuencias de aminoácidos y de ADN correspondientes del péptido o polipéptido, así como de la naturaleza de aminoácidos particulares (p. ej., tamaño, carga, etc.) y el diccionario de codones, sin excesiva experimentación.

Un método general para determinar qué porciones de una proteína usar en una composición inmunológica se centra en el tamaño y la secuencia del antígeno de interés. "En general, las proteínas grandes, porque tienen más determinantes potenciales, son mejores antígenos que las pequeñas. Cuanto más extraño es un antígeno, es decir, menos similar a las autoconfiguraciones que inducen la tolerancia, más eficaz es para provocar una respuesta inmunitaria." Ivan Roitt, Essential Immunology, 1988.

En cuanto al tamaño: el experto en la materia puede maximizar el tamaño de la proteína codificada por la secuencia de ADN para ser insertada en el vector viral (teniendo en cuenta las limitaciones de empaquetamiento del vector). Para minimizar el ADN insertado mientras se maximiza el tamaño de la proteína expresada, la secuencia de ADN puede excluir intrones (regiones de un gen que se transcriben pero que posteriormente se escinden del transcrito de ARN primario).

Como mínimo, la secuencia de ADN puede codificar un péptido de al menos 8 o 9 aminoácidos de longitud. Esta es la longitud mínima que necesita un péptido para estimular una respuesta de linfocitos T CD8 + (que reconoce células infectadas por virus o células cancerosas). Una longitud de péptido mínima de 13 a 25 aminoácidos es útil para estimular una respuesta de linfocitos T CD4 + (que reconoce células presentadoras de antígeno especiales que han envuelto al patógeno). Véase Kendrew, anteriormente citado. Sin embargo, ya que estas son longitudes mínimas, es probable que estos péptidos generen una respuesta inmunológica, es decir, un anticuerpo o respuesta de linfocitos T; pero, para una respuesta protectora (como la producida a partir de una composición de vacuna), se prefiere un péptido más largo.

Con respecto a la secuencia, la secuencia de ADN preferentemente codifica al menos regiones del péptido que generan una respuesta de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T. Un método para determinar los epítomos de linfocitos T y B implica el mapeo de epítomos. La proteína de interés se fragmenta en péptidos solapantes con enzimas proteolíticas o se generan péptidos solapantes mediante la síntesis de oligopéptidos. Los péptidos

individuales se prueban a continuación para determinar su capacidad para unirse a un anticuerpo provocado por la proteína nativa o para inducir la activación de linfocitos T o linfocitos B. Este enfoque ha sido particularmente útil en el mapeo de epítomos de linfocitos T, ya que el linfocito T reconoce péptidos lineales cortos complejados con moléculas del MHC (véase la figura 2). El método es menos eficaz para determinar epítomos de linfocitos B ya que los epítomos de linfocitos B a menudo no son secuencias de aminoácidos lineales, sino que resultan de la estructura terciaria de la proteína tridimensional plegada. Janis Kuby, *Immunology*, (1992) págs. 79-80.

Otro método para determinar un epítomo de interés es elegir las regiones de la proteína que son hidrófilas. Los restos hidrófilos a menudo están en la superficie de la proteína y, por lo tanto, a menudo son las regiones de la proteína que son accesibles al anticuerpo. Janis Kuby, *Immunology*, (1992) pág. 81.

Otro método más para determinar un epítomo de interés es llevar a cabo un análisis cristalográfico de rayos X del complejo antígeno (longitud completa)-anticuerpo. Janis Kuby, *Immunology*, (1992) pág. 80.

Aún otro método para elegir un epítomo de interés que puede generar una respuesta de linfocitos T es identificar, a partir de la secuencia de proteínas, posibles motivos de unión de anclaje a HLA, que son secuencias peptídicas que se sabe que es probable que se unan a la molécula del MHC.

El péptido que es un presunto epítomo de interés, para generar una respuesta de linfocitos T, debería presentarse en un complejo MHC. El péptido contiene preferentemente motivos de anclaje apropiados para unirse a las moléculas del MHC, y debe unirse con una afinidad suficientemente alta para generar una respuesta inmunitaria. Los factores que pueden considerarse son: el tipo de HLA del paciente (vertebrado, animal o ser humano) que se espera inmunizar, la secuencia de la proteína, la presencia de motivos de anclaje apropiados y la aparición de la secuencia peptídica en otras células vitales.

Se genera una respuesta inmunitaria, en general, como se establece a continuación: Los linfocitos T reconocen proteínas solo cuando la proteína se ha escindido en péptidos más pequeños y se presentan en un complejo llamado "complejo principal de histocompatibilidad (MHC)" ubicado en la superficie de otra célula. Hay dos clases de complejos MHC: clase I y clase II, y cada clase está compuesta de muchos alelos diferentes. Las diferentes especies y sujetos individuales tienen diferentes tipos de alelos de complejos del MHC; se dice que tienen un tipo de HLA diferente.

Los complejos MHC de clase I se encuentran prácticamente en todas las células y presentan péptidos de proteínas producidas dentro de la célula. Por lo tanto, los complejos MHC clase I son útiles para matar células cuando se infectan por virus o se han vuelto cancerosas y como resultado de la expresión de un oncogén. Los linfocitos T que tienen una proteína llamada CD8 en su superficie, se unen a las células del MHC de clase I y secretan linfoquinas. Las linfoquinas estimulan una respuesta; las células llegan y matan a la célula infectada viral.

Los complejos MHC de clase II se encuentran solo en células presentadoras de antígeno y se usan para presentar péptidos de patógenos circulantes que han sido endocitados por las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T que tienen una proteína llamada CD4 se unen a las células con MHC de clase II y matan a la célula por exocitosis de gránulos líticas.

Algunas pautas para determinar si una proteína es un epítomo de interés que estimulará una respuesta de linfocitos T, incluyen: Longitud de péptido: el péptido debe tener al menos 8 o 9 aminoácidos de longitud para ajustarse en el complejo MHC de clase I y al menos 13-25 aminoácidos de longitud para ajustarse en un complejo MHC clase II. Esta longitud es un mínimo para que el péptido se una al complejo MHC. Se prefiere que los péptidos sean más largos que estas longitudes porque las células pueden cortar los péptidos expresados. El péptido debe contener un motivo de anclaje apropiado que le permita unirse a las diversas moléculas de clase I o clase II con una especificidad suficientemente alta para generar una respuesta inmunitaria (véase Bocchia, M. et al., *Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class I Molecules*, *Blood* 85:2680-2684; Englehard, V H, *Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules*, *Ann. Rev. Immunol.* 12:181 (1994)). Esto se puede hacer, sin excesiva experimentación, por comparación de la secuencia de la proteína de interés con las estructuras de péptidos publicadas asociadas con las moléculas del MHC. Los epítomos de proteína reconocidos por receptores de linfocitos T son péptidos generados por degradación enzimática de la molécula de proteína y se presentan en la superficie celular en asociación con moléculas MHC de clase I o clase II.

Además, el experto en la materia puede determinar un epítomo de interés por comparación de la secuencia de proteína con las secuencias enumeradas en la base de datos de proteínas. Las regiones de la proteína que comparten poca o ninguna homología son mejores opciones para ser un epítomo de esa proteína y, por lo tanto, son útiles en una composición de vacuna o inmunológica. Deben evitarse las regiones que comparten una gran homología con secuencias ampliamente encontradas presentes en células vitales.

Aún más, otro método es simplemente generar o expresar porciones de una proteína de interés, generar anticuerpos monoclonales contra aquellas porciones de la proteína de interés y luego determinar si esos anticuerpos inhiben el crecimiento in vitro del patógeno del que deriva la proteína. El experto en la materia puede usar las otras directrices

expuestas en esta divulgación y en la técnica para generar o expresar porciones de una proteína de interés para el análisis en cuanto a si los anticuerpos contra las mismas inhiben el crecimiento in vitro. Por ejemplo, el experto en la materia puede generar porciones de una proteína de interés: seleccionando porciones de la proteína de 8 a 9 o 13 a 25 aminoácidos, seleccionando regiones hidrófilas, seleccionando las porciones que, según se demuestra por los datos de rayos X, se unen con el complejo antígeno (longitud completa)-anticuerpo, seleccionando regiones que difieren en secuencia de otras proteínas, seleccionando motivos de unión de anclaje a HLA potenciales, o cualquier combinación de estos métodos u otros métodos conocidos en la técnica.

Los epítomos reconocidos por anticuerpos se expresan en la superficie de una proteína. Para determinar las regiones de una proteína que es más probable que estimulen una respuesta de anticuerpos, un experto en la materia puede llevar a cabo preferentemente un mapa de epítomos, usando los métodos generales descritos anteriormente u otros métodos de mapeo conocidos en la técnica.

Como puede verse a partir de lo anterior, sin excesiva experimentación, a partir de esta divulgación y del conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede determinar el aminoácido y la secuencia de ADN correspondiente de un epítomo de interés para obtener una respuesta de linfocitos T, linfocitos B y/o anticuerpos. Además, se hace referencia a Geffer et al., patente de los Estados Unidos N.º 5.019.384, presentada el 28 de Mayo de 1991 y los documentos que cita, (Observe especialmente la sección "Literatura relevante" de esta patente, y la columna 13 de esta patente que revela que: "Se ha definido una gran cantidad de epítomos para una amplia variedad de organismos de interés. De interés particular son aquellos epítomos a los que se dirigen los anticuerpos neutralizantes.")

Con respecto a la expresión de un modulador de la respuesta biológica, se hace referencia a Wohlstadter, "Selection Methods," documento WO 93/19170, publicado el 30 de septiembre de 1993 y los documentos citados en el mismo.

Por ejemplo, un modulador de la respuesta biológica modula la actividad biológica; por ejemplo, un modulador de la respuesta biológica es un componente modulador tal como una proteína de alto peso molecular asociada con receptores de aminoácidos excitatorios no NMDA y que regula alostéricamente la afinidad de la unión de AMPA (véase Kendrew, citado anteriormente). El recombinante de la presente invención pueden expresar dicha proteína de alto peso molecular.

Más generalmente, la naturaleza ha proporcionado una serie de precedentes de moduladores de respuesta biológica. La modulación de la actividad se puede llevar a cabo a través de mecanismos tan complicados e intrincados como el cambio cuaternario inducido alostérico a la presencia/ausencia simple de sistemas de, por ejemplo, expresión/degradación. De hecho, la represión/activación de la expresión de muchas moléculas biológicas está mediada en sí misma por moléculas cuyas actividades son capaces de ser moduladas a través de una variedad de mecanismos.

La tabla 2 de Neidhardt et al., *Physiology of the Bacterial Cell* (Sinauer Associates Inc., Publishers, 1990), en la página 73, enumera modificaciones químicas de proteínas bacterianas. Como se observa en esa tabla, algunas modificaciones están involucradas en el ensamblaje apropiado y otras modificaciones no, pero en cualquier caso, tales modificaciones son capaces de causar la modulación de la función. A partir de esa tabla, pueden determinarse modulaciones químicas análogas para proteínas de otras células, sin excesiva experimentación.

En algunos casos, la modulación de las funciones biológicas se puede mediar simplemente a través de la localización apropiada/inapropiada de una molécula. Las moléculas pueden funcionar para proporcionar una ventaja o desventaja de crecimiento solo si están dirigidas a una ubicación particular. Por ejemplo, una molécula normalmente no puede ser captada o utilizada por una célula, en función de que esa molécula sea degradada primero por la célula mediante la secreción de una enzima para esa degradación. Por lo tanto, la producción de la enzima por un recombinante puede regular el uso o captación de la molécula por una célula. De forma análoga, el recombinante puede expresar una molécula que se une a la enzima necesaria para la captación o el uso de una molécula, regulando, de este modo, de manera similar su captación o uso.

La señal de localización de las proteínas se lleva a cabo a través de la escisión de péptidos señal que es otro tipo de modulación o regulación. En este caso, una actividad catalítica de endoproteasa específica puede expresarse mediante el recombinante.

Otros ejemplos de mecanismos a través de los cuales puede ocurrir la modulación de la función son las poli-proteínas de virus de ARN, efectos alostéricos e impedimento estérico general covalente y no covalente. El VIH es un ejemplo bien estudiado de un virus de ARN que expresa construcciones de poli-proteínas no funcionales. En el VIH "las poli-proteínas gag, pol y env se procesan para producir, respectivamente, las proteínas estructurales virales p17, p24 y transcriptasa inversa e integrasa de p15 y las dos proteínas de la cubierta gp41 y gp120" (Kohl et al., PNAS USA 85:4686-90 (1988)). La división apropiada de las poli-proteínas es crucial para la replicación del virus, y los viriones que portan proteasa de VIH mutante inactiva no son infecciosos. Este es otro ejemplo de la fusión de proteínas que modulan negativamente su actividad. Por lo tanto, es posible construir virus recombinantes que expresan moléculas que interfieren con endoproteasas, o que proporcionan endoproteasas, para inhibir o potenciar

la expresión natural de ciertas proteínas (interfiriendo o potenciando la escisión).

La utilidad funcional de las enzimas también puede modularse alterando su capacidad de catalizar una reacción. Son ejemplos ilustrativos de moléculas moduladas zimógenos, formación/disociación de complejos funcionales de múltiples subunidades, cadenas de poli-proteínas de virus de ARN, interacciones alostéricas, impedimento estérico general (covalente y no covalente) y una variedad de modificaciones químicas tales como fosforilación, metilación, acetilación, adenilación y uridinilación (véase la Tabla 1 de Neidhardt, citada anteriormente, en la página 315 y la Tabla 2 en la página 73).

Los zimógenos son ejemplos de fusiones de proteínas de origen natural que provocan la modulación de la actividad enzimática. Los zimógenos son una clase de proteínas que se convierten en su estado activo a través de una proteólisis limitada. Véase la Tabla 3 de Reich, *Proteases and Biological Control*, Vol. 2, (1975) en la página 54). La naturaleza ha desarrollado un mecanismo de modulación negativa de la actividad de ciertas enzimas, tales como tripsina, expresando estas enzimas con secuencias peptídicas "líderes" adicionales en sus extremos amino. Con la secuencia peptídica extra, la enzima está en el estado zimógeno inactivo. Tras la escisión de esta secuencia, el zimógeno se convierte en su estado enzimáticamente activo. Las velocidades de reacción globales del zimógeno son "aproximadamente 10^5 a 10^6 veces más bajas que las de la enzima correspondiente" (véase la Tabla 3 de Reich, citada anteriormente en la página 54).

Por lo tanto, es posible modular negativamente la función de ciertas enzimas simplemente mediante la adición de una secuencia peptídica a uno de sus extremos. Por ejemplo, con conocimiento de esta propiedad, un recombinante puede expresar secuencias peptídicas que contienen aminoácidos adicionales en uno o en ambos extremos.

La formación o disociación de enzimas de múltiples subunidades es otra manera a través de la cual puede ocurrir la modulación. Diferentes mecanismos pueden ser responsables de la modulación de la actividad tras la formación o disociación de enzimas de múltiples subunidades.

Por lo tanto, obstaculizando estéricamente las interacciones específicas de la subunidad específica apropiada disminuirá la actividad catalítica. Y por consiguiente, el recombinante de la invención puede expresar una molécula que estéricamente obstaculiza una enzima o un complejo enzimático de origen natural, para modular las funciones biológicas.

Ciertos inhibidores de enzimas proporcionan buenos ejemplos de modulación negativa a través de impedimento o modificación estérica covalente. Los sustratos suicidas que se unen irreversiblemente al sitio activo de una enzima en un aminoácido catalíticamente importante en el sitio activo son ejemplos de modificaciones covalentes que bloquean estéricamente el sitio activo enzimático. Un ejemplo de un sustrato suicida es TPCK para quimotripsina (Fritsch, *Enzyme Structure and Mechanism*, 2ª ed; Freeman & Co. Publishers, 1984). Este tipo de modulación es posible por el recombinante que expresa un sustrato suicida adecuado, para modular de este modo las respuestas biológicas (por ejemplo, limitando la actividad de la enzima).

También hay ejemplos de impedimentos estéricos no covalentes que incluyen muchas moléculas represoras. El recombinante puede expresar moléculas represoras que son capaces de obstaculizar estéricamente y así modular negativamente la función de una secuencia de ADN al evitar interacciones de ADN-ARN polimerasa particulares.

Los efectos alostéricos son otra forma a través de la cual la modulación se lleva a cabo en algunos sistemas biológicos. La aspartato transcarbamoilasa es una enzima alostérica bien caracterizada. Interactuando con las subunidades catalíticas son dominios reguladores. Tras la unión a CTP o UTP, las subunidades reguladoras son capaces de inducir un cambio estructural cuaternario en la holoenzima que causa la modulación negativa de la actividad catalítica. Por el contrario, la unión de ATP a las subunidades reguladoras es capaz de provocar la modulación positiva de la actividad catalítica (Fritsch, citado anteriormente). Usando los métodos de la invención, se pueden expresar moléculas que son capaces de unirse y provocar cambios moduladores cuaternarios o terciarios.

Además, se pueden llevar a cabo una variedad de modificaciones químicas, por ejemplo, fosforilación, metilación, acetilación, adenilación y uridinilación, para modular la función. Se sabe que las modificaciones de este tipo desempeñan papeles importantes en la regulación de muchos componentes celulares importantes. La tabla 2 de Neidhardt, citada anteriormente, en la página 73, enumera diferentes enzimas bacterianas que experimentan tales modificaciones. A partir de esa lista, un experto en la materia puede determinar otras enzimas de otros sistemas que experimentan las mismas o similares modificaciones, sin excesiva experimentación. Además, muchas proteínas que están implicadas en enfermedades humanas también experimentan tales modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha encontrado que muchos oncogenes se modifican por fosforilación o modifican otras proteínas a través de la fosforilación o desfosforilación. Por lo tanto, la capacidad proporcionada por la invención para expresar moduladores que pueden modificar o alterar la función, por ejemplo, fosforilación, es importante.

Por lo anterior, el experto en la materia puede usar la presente invención para expresar un modulador de respuesta biológica, sin ninguna experimentación excesiva.

Con respecto a la expresión de proteínas de fusión por recombinantes de la invención, se hace referencia a Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL (segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) (especialmente el Volumen 3), y Kendrew, anteriormente citado. Las enseñanzas de Sambrook et al., pueden modificarse adecuadamente, sin excesiva experimentación, a partir de esta divulgación, para que el experto en la materia genere recombinantes que expresen proteínas de fusión.

Con respecto a la terapia génica e inmunoterapia, se hace referencia a las patentes de los Estados Unidos N.º 4.690.915 y 5.252.479 junto con los documentos citados en ellas y en su portada y al documento WO 94/16716 y la solicitud de Estados Unidos n.º 08/184.009, presentada el 19 de enero de 1994, junto con los documentos allí citados.

Un factor de crecimiento puede definirse como péptidos de señalización intercelulares multifuncionales que actúan localmente, que controlan tanto la ontogenia como el mantenimiento de tejido y función (véase Kendrew, especialmente la página 455 y siguientes).

El factor de crecimiento o gen terapéutico, por ejemplo, puede codificar una proteína que combate enfermedades, una molécula para tratar cáncer, un supresor tumoral, una citoquina, un antígeno asociado a un tumor o interferón; y, el factor de crecimiento o gen terapéutico puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en un gen que codifica alfa globina, beta globina, gammaglobina, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de necrosis tumoral, una interleucina (por ejemplo, una interleucina seleccionada de las interleucinas 1 a 14 o 1 a 11 o cualquier combinación de las mismas), factor estimulador de colonias de macrófagos, factor estimulador de colonias de granulocitos, eritropoyetina, factor de crecimiento de mastocitos, supresor tumoral p53, retinoblastoma, interferón, antígeno asociado al melanoma o B7. La patente de los Estados Unidos N.º 5.252.479 proporciona un listado de proteínas que pueden expresarse en un sistema de adenovirus para terapia génica y se dirige al experto en la materia a esta divulgación. El documento WO 94/16716 y la solicitud de los Estados Unidos N.º 08/184.009, presentada el 19 de enero de 1994, proporcionan genes para citoquinas y antígenos asociados a tumores y métodos de inmunoterapia, incluyendo métodos ex vivo y se dirige al experto en la materia a esas divulgaciones.

Por lo tanto, un experto en la materia puede crear recombinantes que expresan un factor de crecimiento o gen terapéutico y usar los recombinantes, a partir de esta divulgación y del conocimiento en la técnica, sin excesiva experimentación.

Además, a partir de esta divulgación y del conocimiento en la técnica, no se requiere experimentación excesiva para el experto en la materia para construir un recombinante de la invención que exprese un epítipo de interés, un modulador de respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión; o para un experto en la materia para usar tal recombinante.

Debe tenerse en cuenta que el ADN exógeno o heterólogo puede incluir en sí mismo un promotor para dirigir la expresión en el CMV recombinante, o el ADN exógeno puede simplemente estar codificando ADN y colocarse apropiadamente cadena abajo de un promotor endógeno de CMV para dirigir la expresión. Además, se pueden hacer copias múltiples de ADN codificante o el uso de un promotor fuerte o temprano o un promotor temprano y tardío, o cualquier combinación de los mismos, para amplificar o aumentar la expresión. Por lo tanto, el ADN exógeno o heterólogo puede posicionarse adecuadamente con respecto a un promotor endógeno de CMV, o esos promotores pueden translocarse para insertarse en otra ubicación, con el ADN exógeno o heterólogo. El ADN codificante puede ser ADN que codifica más de una proteína para tener expresión de más de un producto de CMV recombinante.

Los productos de expresión pueden ser antígenos, inmunógenos o epítopos de interés; y por lo tanto, la invención se refiere además a composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna que contienen los productos de expresión. Además, dado que el vector de CMV, en ciertos casos, se puede administrar directamente a un hospedador adecuado, la invención se refiere a composiciones que contienen el vector de CMV. Además, dado que el producto de expresión se puede aislar del vector de CMV in vitro o de células infectadas o transfectadas por el vector de CMV in vitro, la invención se refiere a métodos para expresar un producto, por ejemplo, que puede comprender insertar el ADN exógeno en un CMV como un vector, por ejemplo, por restricción/ligación o por recombinación seguida de infección o transfección de células adecuadas in vitro con un CMV recombinante y, opcionalmente, extracción, purificación o aislamiento del producto de expresión de las células. Se puede emplear cualquier técnica de extracción, purificación o aislamiento adecuada.

En particular, después de infectar células con el CMV recombinante, la(s) proteína(s) de expresión del ADN exógeno se recogen mediante técnicas conocidas tales como cromatografía (véase Robbins, EPA 0162738A1; Panicali, EPA 0261940A2); Richardson, citado anteriormente; Smith et al., citado anteriormente; Pennock et al., citado anteriormente; publicación de patente EP N.º 0265785). La(s) proteína(s) recogida(s) puede(n) emplearse en una vacuna, composición antigénica o inmunológica que también contiene un vehículo adecuado.

Por lo tanto, el CMV recombinante puede usarse para preparar proteínas tales como antígenos, inmunógenos, epítopos de interés, etc. que pueden usarse adicionalmente en composiciones inmunológicas, antigénicas o de

vacuna. Debe tenerse en cuenta que un CMV recombinante que expresa un producto perjudicial para el crecimiento o desarrollo de insectos se puede usar para preparar un insecticida, y se puede usar un CMV recombinante que expresa un producto perjudicial para el crecimiento de plantas para preparar un herbicida (aislando el producto de expresión y mezclándolo con un vehículo o diluyente aceptable como insecticida o herbicida) y se puede usar un
 5 CMV recombinante que expresa un polipéptido antifúngico para preparar una preparación antifúngica (aislando el producto de expresión y mezclándolo con un vehículo o diluyente adecuado).

Como los productos de expresión pueden proporcionar una respuesta antigénica, inmunológica o protectora (vacuna), la invención se refiere además a productos a partir de la misma; concretamente, a anticuerpos y a usos de
 10 los mismos. Más en particular, los productos de expresión pueden provocar anticuerpos. Los anticuerpos se pueden transformar en anticuerpos monoclonales; y, los anticuerpos o productos de expresión se pueden usar en kits, ensayos, pruebas y similares que implican unión, de modo que la invención también se refiere a estos usos. Además, dado que los recombinantes de la invención se pueden usar para replicar ADN, la invención se refiere a
 15 CMV recombinante como vector y a métodos para replicar ADN infectando o transfectando células con el recombinante y recolectando ADN del mismo. El ADN resultante puede usarse como sondas o cebadores o para amplificación.

El procedimiento de administración para CMV recombinante o producto de expresión del mismo, composiciones de la invención tales como composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o composiciones terapéuticas puede
 20 ser a través de una vía parenteral (intradérmica, intramuscular o subcutánea). Tal administración permite una respuesta inmunitaria sistémica. La administración puede ser a través de una vía mucosa, por ejemplo, oral, nasal, genital, etc. Tal administración permite una respuesta inmunitaria sistémica.

Más generalmente, las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna o composiciones terapéuticas de la invención (composiciones que contienen los recombinantes de CMV de la invención o productos de expresión)
 25 pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica farmacéutica. Tales composiciones se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médicas teniendo en cuenta factores tales como la raza o especie, edad, sexo, peso y condición del paciente particular y la vía de administración. Las composiciones pueden administrarse solas, o
 30 pueden administrarse conjuntamente o administrarse secuencialmente con otras composiciones de la invención o con otras composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o terapéuticas. Tales composiciones pueden incluir antígenos o epítomos nativos purificados o antígenos o epítomos de la expresión mediante un CMV recombinante u otro sistema de vector; y se administran teniendo en cuenta los factores antes mencionados.

Los ejemplos de composiciones de la invención incluyen preparaciones líquidas para orificios, por ejemplo, oral, nasal, anal, genital, por ejemplo, vaginal, etc., administración como suspensiones, jarabes o elixires; y,
 35 preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tales como suspensiones o emulsiones estériles. En tales composiciones el recombinante puede estar en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua, solución salina fisiológica,
 40 glucosa o similares.

Las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna normalmente pueden contener un adyuvante y una cantidad de CMV recombinante o producto de expresión para provocar la respuesta deseada. En aplicaciones humanas, el alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) es un adyuvante típico. La saponina y su
 45 componente purificado Quil A, el adyuvante completo de Freund y otros adyuvantes utilizados en investigación y aplicaciones veterinarias tienen toxicidades que limitan su uso potencial en vacunas humanas. Se pueden usar también preparaciones definidas químicamente tales como muramil dipéptido, monofosforil lípido A, conjugados de fosfolípidos tales como los descritos por Goodman-Snitkoff et al., J. Immunol. 147:410-415 (1991), encapsulación de la proteína con un proteoliposoma como se describe por Miller et al., J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992) y la
 50 encapsulación de la proteína en vesículas de lípido tales como vesículas de lípido Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, N.H.).

La composición puede envasarse en forma de dosis única para la inmunización por administración parenteral (es decir, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración de orificio, por ejemplo, administración perlingual
 55 (es decir, oral), intragástrica, mucosa que incluye intraoral, intraanal, intravaginal y similares. Y de nuevo, la dosis eficaz y la vía de administración están determinadas por la naturaleza de la composición, por la naturaleza del producto de expresión, por nivel de expresión si se usa directamente CMV recombinante, y por factores conocidos, tales como raza o especie, edad, sexo, peso, condición y naturaleza del hospedador, así como DL₅₀ y otros procedimientos de selección que son conocidos y no requieren una experimentación excesiva. Las dosis del
 60 producto expresado pueden variar desde unos pocos hasta algunos cientos de microgramos, *por ejemplo*, de 5 a 500 µg. El recombinante de la invención se puede administrar en cualquier cantidad adecuada para lograr la expresión a estos niveles de dosificación. El CMV vacunal se administra en una cantidad de, al menos, 10² ufp; por lo tanto, el recombinante de la invención puede administrarse en al menos esta cantidad; o en un intervalo de aproximadamente 10² ufp a aproximadamente 10⁷ ufp. Otros vehículos o diluyentes adecuados pueden ser agua o una solución salina tamponada, con o sin un conservante. El producto de expresión o CMV recombinante puede
 65 liofilizarse para la resuspensión en el momento de la administración o puede estar en solución.

El vehículo también puede ser un sistema polimérico de liberación retardada. Los polímeros sintéticos son particularmente útiles en la formulación de una composición que tiene liberación controlada. Un primer ejemplo de esto fue la polimerización de metacrilato de metilo en esferas con diámetros menores a una micra para formar las llamadas nanopartículas, presentado por Kreuter, J., *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology*, M. Donbrow (Ed). CRC Press, págs. 125-148.

La microencapsulación se ha aplicado a la inyección de productos farmacéuticos microencapsulados para proporcionar una liberación controlada. Varios factores contribuyen a la selección de un polímero particular para la microencapsulación. La reproducibilidad de la síntesis del polímero y el proceso de microencapsulación, el coste de los materiales y procesos de microencapsulación, el perfil toxicológico, los requisitos para las cinéticas de liberación variables y la compatibilidad fisicoquímica del polímero y los antígenos son todos factores que deben considerarse. Son ejemplos de polímeros útiles policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres y poliamidas, particularmente aquellos que son biodegradables.

Una elección frecuente de un vehículo para productos farmacéuticos y más recientemente para antígenos es poli(D, L-láctido-co-glicólido) (PLGA). Este es un poliéster biodegradable que tiene una larga historia de uso médico en suturas erosionables, placas óseas y otras prótesis temporales donde no ha presentado ninguna toxicidad. Se ha formulado una amplia variedad de productos farmacéuticos que incluyen péptidos y antígenos en microcápsulas de PLGA. Se ha acumulado un conjunto de datos sobre la adaptación de PLGA para la liberación controlada de antígeno, por ejemplo, según lo revisado por Eldridge, J. H., et al., *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1989, 146:59-66. Se ha mostrado que el atrapamiento de antígenos en microesferas de PLGA de 1 a 10 micras de diámetro tiene un notable efecto adyuvante cuando se administra por vía oral. El proceso de microencapsulación de PLGA utiliza una separación de fases de una emulsión de agua en aceite. El compuesto de interés se prepara como una solución acuosa y el PLGA se disuelve en disolventes orgánicos adecuados tales como cloruro de metileno y acetato de etilo. Estas dos soluciones inmiscibles se coemulsionan por agitación a alta velocidad. A continuación, se añade un no disolvente para el polímero, provocando la precipitación del polímero alrededor de las gotas acuosas para formar microcápsulas embrionarias. Las microcápsulas se recogen y se estabilizan con uno de una variedad de agentes (poli(alcohol vinílico) (PVA), gelatina, alginatos, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa) y el disolvente se elimina por secado al vacío o extracción de disolvente.

Por lo tanto, se prevén composiciones sólidas, líquidas que contienen sólidos, líquidas y de gel (incluyendo "cápsulas de gel").

Además, los vectores de la invención, por ejemplo, CMV recombinante y los productos de expresión del mismo pueden estimular una respuesta inmunitaria o de anticuerpos en animales. A partir de esos anticuerpos, mediante técnicas bien conocidas en la técnica, se pueden preparar anticuerpos monoclonales y esos anticuerpos monoclonales pueden emplearse en ensayos de unión de anticuerpos bien conocidos, kits de diagnóstico o pruebas para determinar la presencia o ausencia de antígeno(s) y de ahí la presencia o ausencia del agente causal natural del antígeno o, para determinar si se ha estimulado simplemente una respuesta inmunitaria a ese agente o al/a los antígeno(s).

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas producidas por células de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal reacciona con un único determinante antigénico y proporciona una especificidad mayor que un anticuerpo derivado de suero convencional. Además, el cribado de un gran número de anticuerpos monoclonales permite seleccionar un anticuerpo individual con la especificidad, avidez e isotipo deseados. Las líneas celulares del hibridoma proporcionan una fuente constante y económica de anticuerpos químicamente idénticos y las preparaciones de tales anticuerpos se pueden estandarizar fácilmente. Los métodos para obtener anticuerpos monoclonales son bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, Koprowski, H. et al., patente de los Estados Unidos N.º 4.196.265, expedida el 1 de abril de 1989.

Se conocen usos de anticuerpos monoclonales. Uno de esos usos es en los métodos de diagnóstico, por ejemplo, David, G. y Greene, H., patente de los Estados Unidos N.º 4.376.110, expedida el 8 de marzo de 1983.

Los anticuerpos monoclonales también se han usado para recuperar materiales mediante cromatografía de inmunoadsorción, por ejemplo, Milstein, C., 1980, *Scientific American* 243:66, 70.

Además, el CMV recombinante de la invención o los productos de expresión del mismo se pueden usar para estimular una respuesta en células in vitro o ex vivo para reinfusión posterior en un paciente. Si el paciente es seronegativo, la reinfusión es para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunológica o antigénica tal como inmunización activa. En un individuo seropositivo, la reinfusión es para estimular o reforzar el sistema inmunitario contra un patógeno.

El CMV recombinante de la invención también es útil para generar ADN para sondas o para cebadores de PCR que pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de ADN hibridable o para amplificar ADN, por ejemplo, para detectar un patógeno en una muestra para amplificar el ADN.

Además, tal como se ha tratado anteriormente, la invención comprende promotores y casetes de expresión que son útiles en sistemas de adenovirus, así como en cualquier sistema viral o celular que proporcione una proteína de transactivación.

- 5 El casete de expresión de la invención puede incluir además una señal de poliadenilación truncada funcional; por ejemplo, una señal de poliadenilación de SV40 que está truncada, aunque es funcional. El casete de expresión también puede contener ADN exógeno o heterólogo (con respecto al virus o sistema en el que se inserta el promotor o casete de expresión); por ejemplo, ADN codificante exógeno o heterólogo como se describe anteriormente en el presente documento y en los Ejemplos. Este ADN puede colocarse adecuadamente y unirse operativamente al
10 promotor para su expresión. El casete de expresión se puede insertar en cualquier orientación; preferentemente la orientación que obtiene la expresión máxima del sistema o virus en el que se inserta el casete de expresión.

Aunque el promotor y el casete de expresión se ejemplifican específicamente con referencia a adenovirus, el experto en la materia puede adaptar estas realizaciones de la invención a otros virus y a plásmidos para células tales como
15 células eucariotas, sin excesiva experimentación, simplemente determinando si el virus, plásmido, célula o sistema proporciona la proteína transactivadora.

En cuanto a los promotores de CMV, se hace referencia a las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.168.062 y 5.385.839. En cuanto a transfección de células con ADN de plásmido para la expresión del mismo, se hace
20 referencia a Felgner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561. Y, en cuanto a la inyección directa de ADN de plásmido como un método simple y eficaz de vacunación contra una variedad de enfermedades infecciosas (se hace referencia a Science, 259: 1745-49, 1993). Por lo tanto, está dentro del alcance de esta invención que el promotor y el casete de expresión de la invención se usen en sistemas distintos de adenovirus; por ejemplo, en plásmidos para la inyección directa de ADN de plásmido.

25 Los fragmentos de proteína de la presente invención forman un aspecto adicional de la invención; y, tales compuestos se pueden usar en métodos de tratamientos médicos, tales como para diagnóstico, prevención o tratamiento de VIH o para provocar anticuerpos para el diagnóstico de VIH, incluido el uso en vacunas. Además, tales compuestos se pueden usar en la preparación de medicamentos para tales tratamientos o prevención, o composiciones para fines diagnósticos. Las composiciones se pueden emplear solas o en combinación con otros
30 tratamientos, vacunas o preventivos; y, los compuestos se pueden usar en la preparación de medicamentos combinados para tales tratamientos o prevención, o en kits que contienen el compuesto y el otro tratamiento o preventivo.

35 En otra realización más, la presente invención también abarca el uso de los fragmentos de proteína de la presente invención descritos en el presente documento como inmunógenos, ventajosamente como componentes de vacuna de VIH-1.

40 Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "secuencia de aminoácidos" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de restos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un
45 componente de marcaje o bioactivo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno" se usan indistintamente para referirse a una sustancia, normalmente una proteína, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. El término también se refiere a proteínas que son inmunológicamente activas en el sentido de que una vez
50 administradas a un sujeto (ya sea directamente o mediante la administración al sujeto de una secuencia de nucleótidos o vector que codifica la proteína) es capaz de provocar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigido contra esa proteína.

El término "anticuerpo" incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv y scFv que son capaces de unirse al determinante del epítipo. Estos fragmentos de anticuerpo retienen cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor e incluyen, por ejemplo:

- a. Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una
60 cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
- b. Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo, se puede obtener por tratamiento del anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena intacta ligera y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
- c. F(ab')₂, el fragmento de anticuerpo se puede obtener por tratamiento del anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos
65 enlaces disulfuro;

d. scFv, incluyendo un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de una cadena pesada y una ligera como una molécula de cadena simple condensada.

5 Los métodos generales para fabricar estos fragmentos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988).

10 Un "anticuerpo neutralizante" puede inhibir la entrada del virus VIH-1, por ejemplo SF162 y/o JRCSF con un índice de neutralización mayor de 1,5 o mayor de 2,0. Los anticuerpos neutralizantes amplios y potentes pueden neutralizar más de aproximadamente el 50% de los virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización. La concentración inhibitoria de anticuerpo monoclonal puede ser inferior a aproximadamente 25 mg/ml para neutralizar aproximadamente el 50% del virus de entrada en el ensayo de neutralización.

15 Debe entenderse que las proteínas y los ácidos nucleicos que los codifican pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. Por lo tanto, la invención contempla delecciones, adiciones, truncamientos y sustituciones en las secuencias mostradas, siempre que las secuencias funcionen de acuerdo con los métodos de la invención. A este respecto, las sustituciones generalmente serán de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácido - aspartato y glutamato; (2) básico - lisina, arginina, histidina; (3) alanina no polar, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) glicina polar sin carga, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente predecible que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa; una treonina con una serina o viceversa; o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias ilustradas y descritas pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro del alcance de la invención.

20 Como se usa en el presente documento, las expresiones "secuencias de nucleótidos" y "secuencias de ácidos nucleicos" se refieren a secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), que incluyen, sin limitación, ARN mensajero (ARNm), híbridos ADN/ARN o ácidos nucleicos sintéticos. El ácido nucleico puede ser monocatenario, o parcialmente o completamente bicatenario (dúplex). Los ácidos nucleicos dúplex pueden ser homodúplex o heterodúplex.

25 Como se usa en el presente documento, el término "transgén" se puede usar para referirse a secuencias de nucleótidos "recombinantes" que pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención. El término "recombinante" significa una secuencia de nucleótidos que se ha manipulado "por el hombre" y que no ocurre en la naturaleza, o está unida a otra secuencia de nucleótidos o se encuentra en una disposición diferente en la naturaleza. Se entiende que manipulado "por el hombre" significa manipulado por algún medio artificial, incluso mediante el uso de máquinas, optimización de codones, enzimas de restricción, etc.

30 Por ejemplo, en una realización, las secuencias de nucleótidos se pueden mutar de manera que se anule la actividad de las proteínas codificadas in vivo. En otra realización, las secuencias de nucleótidos pueden ser de codones optimizados, por ejemplo, los codones se pueden optimizar para uso humano. En realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos de la invención están tanto mutadas para anular la función in vivo normal de las proteínas codificadas como sometidas a optimización de codones para uso humano. Por ejemplo, cada una de las secuencias Gag, Pol, Env, Nef, RT e Int de la invención se pueden alterar de estas maneras.

35 Con respecto a la optimización de codones, las moléculas de ácido nucleico de la invención tienen una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos de la invención y pueden diseñarse para emplear codones que se usan en los genes del sujeto en el que se va a producir el antígeno. Muchos virus, incluyendo VIH y otros lentivirus, usan una gran cantidad de codones raros y, al alterar estos codones para que correspondan a los codones comúnmente usados en el sujeto deseado, se puede lograr una expresión potenciada de los antígenos. En una realización preferida, los codones utilizados son codones "humanizados", es decir, los codones son los que aparecen con frecuencia en genes humanos altamente expresados (Andre y col., *J. Virol.* 72: 1497-1503, 1998) en lugar de aquellos codones que son frecuentemente utilizados por VIH. Tal uso de codones proporciona una expresión eficaz de las proteínas de VIH transgénicas en células humanas. Se puede usar cualquier método adecuado de optimización de codones. Tales métodos y la selección de tales métodos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, hay varias compañías que optimizarán codones de secuencias, tales como Genart (genart.com). Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden optimizarse fácilmente con codones.

60 La invención abarca además secuencias de nucleótidos que codifican variantes y derivados funcionalmente y/o antigénicamente equivalentes de los vectores de CMV y las glucoproteínas incluidas en ellos. Estas variantes,

derivados y fragmentos funcionalmente equivalentes muestran la capacidad de retener actividad antigénica. Por ejemplo, los cambios en una secuencia de ADN que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada, así como aquellos que dan como resultado sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos, una o unas pocas delecciones o adiciones de aminoácidos y la sustitución de restos de aminoácidos por análogos de aminoácidos son modificaciones que no afectarán significativamente a las propiedades del polipéptido codificado. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina/triptófano. En una realización, las variantes tienen al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 87%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o, al menos 99% de homología o identidad con el antígeno, epítipo, inmunógeno, péptido o polipéptido de interés.

Para los fines de la presente invención, la identidad u homología de la secuencia se determina comparando las secuencias cuando están alineadas para maximizar la superposición y la identidad a la vez que se minimizan los huecos de secuencia. En particular, la identidad de secuencia puede determinarse usando cualquiera de una serie de algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993;90: 5873-5877.

Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS 1988;4: 11-17. Tal algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de pesos de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Otro algoritmo más, útil para identificar regiones de similitud y alineación de secuencia local es el algoritmo FASTA tal como se describe en Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444-2448.

El software WU-BLAST es ventajoso para el uso de acuerdo con la presente invención (Washington University BLAST) versión 2.0. Los programas ejecutables WU-BLAST versión 2.0 para varias plataformas UNIX se pueden descargar desde <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Este programa se basa en la versión 1.4 de WU-BLAST, que a su vez se basa en el dominio público NCBI-BLAST versión 1.4 (Altschul y Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul et al., Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish y States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin y Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877).

Las diversas secuencias de nucleótidos recombinantes y los anticuerpos y/o antígenos de la invención se preparan usando técnicas de clonación y ADN recombinante convencionales. Tales técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al. 1989).

La secuencia de nucleótidos de la presente invención también se puede insertar en "vectores." El término "vector" es ampliamente utilizado y entendido por los expertos en la materia, y tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se usa de forma coherente con su significado para los expertos en la materia. Por ejemplo, el término "vector" es comúnmente utilizado por los expertos en la materia para referirse a un vehículo que permite o facilita la transferencia de moléculas de ácido nucleico de un entorno a otro o que permite o facilita la manipulación de una molécula de ácido nucleico.

Cualquier virus que permita la expresión de los virus de la presente invención se puede usar de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, los virus de la presente invención pueden usarse in vitro (tal como usando sistemas de expresión libres de células) y/o en células de cultivo cultivadas in vitro para producir los antígenos de VIH codificados y/o anticuerpos que pueden usarse a continuación para diversas aplicaciones tales como en la producción de vacunas proteicas. Para estas aplicaciones, se puede usar cualquier vector que permita la expresión del virus in vitro y/o en células cultivadas.

Para que se expresen los antígenos exógenos de la presente invención, la secuencia codificante de la proteína del antígeno exógeno se debe "unir operativamente" a las secuencias reguladoras o de control del ácido nucleico que dirigen la transcripción y la traducción de la proteína. Tal como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia codificante y una secuencia o promotor de control de ácido nucleico, están "operativamente unidas" cuando están unidas covalentemente de tal manera que colocan la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o control de la secuencia de control de ácido nucleico. La "secuencia de control de ácido nucleico" puede ser cualquier elemento de ácido nucleico, tal como, pero sin limitación, promotores, potenciadores, IRES, intrones y otros elementos descritos en el presente documento que dirigen la expresión de una secuencia de ácido nucleico o de una secuencia codificante que está operativamente ligada a la misma. El término "promotor" se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están agrupados alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II y que cuando se unen operativamente a las secuencias codificantes de proteínas de la invención conducen a la expresión de la proteína codificada. La

expresión de los transgenes de la presente invención puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible, que inicia la transcripción solamente cuando se expone a algún estímulo externo particular, tal como, sin limitación, antibióticos como tetraciclina, hormonas como ecdisona o metales pesados. El promotor también puede ser específico para un tipo celular, tejido u órgano particular. Se conocen muchos promotores y potenciadores adecuados en la técnica y cualquier promotor o potenciador adecuado de este tipo se puede usar para la expresión de los transgenes de la invención. Por ejemplo, pueden seleccionarse promotores y/o potenciadores adecuados de la base de datos de promotores eucarióticos (EPDB).

La presente invención se refiere a un vector viral recombinante que expresa un epítipo extraño. Favorablemente, el epítipo es un epítipo de VIH. En una realización ventajosa, el epítipo de VIH es un fragmento de proteína de la presente invención, sin embargo, la presente invención puede abarcar antígenos, epítipos o inmunógenos de VIH adicionales. Favorablemente, el epítipo es un antígeno de VIH que incluye, aunque sin limitación, los antígenos de VIH de las patentes de los Estados Unidos N.º 7.341.731; 7.335.364; 7.329.807; 7.323.553; 7.320.859; 7.311.920; 7.306.798; 7.285.646; 7.285.289; 7.285.271; 7.282.364; 7.273.695; 7.270.997; 7.262.270; 7.244.819; 7.244.575; 7.232.567; 7.232.566; 7.223.844; 7.223.739; 7.223.534; 7.223.368; 7.220.554; 7.214.530; 7.211.659; 7.211.432; 7.205.159; 7.198.934; 7.195.768; 7.192.555; 7.189.826; 7.189.522; 7.186.507; 7.179.645; 7.175.843; 7.172.761; 7.169.550; 7.157.083; 7.153.509; 7.147.862; 7.141.550; 7.129.219; 7.122.188; 7.118.859; 7.118.855; 7.118.751; 7.118.742; 7.105.655; 7.101.552; 7.097.971; 7.097.842; 7.094.405; 7.091.049; 7.090.648; 7.087.377; 7.083.787; 7.070.787; 7.070.781; 7.060.273; 7.056.521; 7.056.519; 7.049.136; 7.048.929; 7.033.593; 7.030.094; 7.022.326; 7.009.037; 7.008.622; 7.001.759; 6.997.863; 6.995.008; 6.979.535; 6.974.574; 6.972.126; 6.969.609; 6.964.769; 6.964.762; 6.958.158; 6.956.059; 6.953.689; 6.951.648; 6.946.075; 6.927.031; 6.919.319; 6.919.318; 6.919.077; 6.913.752; 6.911.315; 6.908.617; 6.908.612; 6.902.743; 6.900.010; 6.893.869; 6.884.785; 6.884.435; 6.875.435; 6.867.005; 6.861.234; 6.855.539; 6.841.381; 6.841.345; 6.838.477; 6.821.955; 6.818.392; 6.818.222; 6.815.217; 6.815.201; 6.812.026; 6.812.025; 6.812.024; 6.808.923; 6.806.055; 6.803.231; 6.800.613; 6.800.288; 6.797.811; 6.780.967; 6.780.598; 6.773.920; 6.764.682; 6.761.893; 6.753.015; 6.750.005; 6.737.239; 6.737.067; 6.730.304; 6.720.310; 6.716.823; 6.713.301; 6.713.070; 6.706.859; 6.699.722; 6.699.656; 6.696.291; 6.692.745; 6.670.181; 6.670.115; 6.664.406; 6.657.055; 6.657.050; 6.656.471; 6.653.066; 6.649.409; 6.649.372; 6.645.732; 6.641.816; 6.635.469; 6.613.530; 6.605.427; 6.602.709; 6.602.705; 6.600.023; 6.596.477; 6.596.172; 6.593.103; 6.593.079; 6.579.673; 6.576.758; 6.573.245; 6.573.040; 6.569.418; 6.569.340; 6.562.800; 6.558.961; 6.551.828; 6.551.824; 6.548.275; 6.544.780; 6.544.752; 6.544.728; 6.534.482; 6.534.312; 6.534.064; 6.531.572; 6.531.313; 6.525.179; 6.525.028; 6.524.582; 6.521.449; 6.518.030; 6.518.015; 6.514.691; 6.514.503; 6.511.845; 6.511.812; 6.511.801; 6.509.313; 6.506.384; 6.503.882; 6.495.676; 6.495.526; 6.495.347; 6.492.123; 6.489.131; 6.489.129; 6.482.614; 6.479.286; 6.479.284; 6.465.634; 6.461.615; 6.458.560; 6.458.527; 6.458.370; 6.451.601; 6.451.592; 6.451.323; 6.436.407; 6.432.633; 6.428.970; 6.428.952; 6.428.790; 6.420.139; 6.416.997; 6.410.318; 6.410.028; 6.410.014; 6.407.221; 6.406.710; 6.403.092; 6.399.295; 6.392.013; 6.391.657; 6.384.198; 6.380.170; 6.376.170; 6.372.426; 6.365.187; 6.358.739; 6.355.248; 6.355.247; 6.348.450; 6.342.372; 6.342.228; 6.338.952; 6.337.179; 6.335.183; 6.335.017; 6.331.404; 6.329.202; 6.329.173; 6.328.976; 6.322.964; 6.319.666; 6.319.665; 6.319.500; 6.319.494; 6.316.205; 6.316.003; 6.309.633; 6.306.625; 6.296.807; 6.294.322; 6.291.239; 6.291.157; 6.287.568; 6.284.456; 6.284.194; 6.274.337; 6.270.956; 6.270.769; 6.268.484; 6.265.562; 6.265.149; 6.262.029; 6.261.762; 6.261.571; 6.261.569; 6.258.599; 6.258.358; 6.248.332; 6.245.331; 6.242.461; 6.241.986; 6.235.526; 6.235.466; 6.232.120; 6.228.361; 6.221.579; 6.214.862; 6.214.804; 6.210.963; 6.210.873; 6.207.185; 6.203.974; 6.197.755; 6.197.531; 6.197.496; 6.194.142; 6.190.871; 6.190.666; 6.168.923; 6.156.302; 6.153.408; 6.153.393; 6.153.392; 6.153.378; 6.153.377; 6.146.635; 6.146.614; 6.143.876; 6.140.059; 6.140.043; 6.139.746; 6.132.992; 6.124.306; 6.124.132; 6.121.006; 6.120.990; 6.114.507; 6.114.143; 6.110.466; 6.107.020; 6.103.521; 6.100.234; 6.099.848; 6.099.847; 6.096.291; 6.093.405; 6.090.392; 6.087.476; 6.083.903; 6.080.846; 6.080.725; 6.074.650; 6.074.646; 6.070.126; 6.063.905; 6.063.564; 6.060.256; 6.060.064; 6.048.530; 6.045.788; 6.043.347; 6.043.248; 6.042.831; 6.037.165; 6.033.672; 6.030.772; 6.030.770; 6.030.618; 6.025.141; 6.025.125; 6.020.468; 6.019.979; 6.017.543; 6.017.537; 6.015.694; 6.015.661; 6.013.484; 6.013.432; 6.007.838; 6.004.811; 6.004.807; 6.004.763; 5.998.132; 5.993.819; 5.989.806; 5.985.926; 5.985.641; 5.985.545; 5.981.537; 5.981.505; 5.981.170; 5.976.551; 5.972.339; 5.965.371; 5.962.428; 5.962.318; 5.961.979; 5.961.970; 5.958.765; 5.958.422; 5.955.647; 5.955.342; 5.951.986; 5.951.975; 5.942.237; 5.939.277; 5.939.074; 5.935.580; 5.928.930; 5.928.913; 5.928.644; 5.928.642; 5.925.513; 5.922.550; 5.922.325; 5.919.458; 5.916.806; 5.916.563; 5.914.395; 5.914.109; 5.912.338; 5.912.176; 5.912.170; 5.906.936; 5.895.650; 5.891.623; 5.888.726; 5.885.580; 5.885.578; 5.879.685; 5.876.731; 5.876.716; 5.874.226; 5.872.012; 5.871.747; 5.869.058; 5.866.694; 5.866.341; 5.866.320; 5.866.319; 5.866.137; 5.861.290; 5.858.740; 5.858.647; 5.858.646; 5.858.369; 5.858.368; 5.858.366; 5.856.185; 5.854.400; 5.853.736; 5.853.725; 5.853.724; 5.852.186; 5.851.829; 5.851.529; 5.849.475; 5.849.288; 5.843.728; 5.843.723; 5.843.640; 5.843.635; 5.840.480; 5.837.510; 5.837.250; 5.837.242; 5.834.599; 5.834.441; 5.834.429; 5.834.256; 5.830.876; 5.830.641; 5.830.475; 5.830.458; 5.830.457; 5.827.749; 5.827.723; 5.824.497; 5.824.304; 5.821.047; 5.817.767; 5.817.754; 5.817.637; 5.817.470; 5.817.318; 5.814.482; 5.807.707; 5.804.604; 5.804.371; 5.800.822; 5.795.955; 5.795.743; 5.795.572; 5.789.388; 5.780.279; 5.780.038; 5.776.703; 5.773.260; 5.770.572; 5.766.844; 5.766.842; 5.766.625; 5.763.574; 5.763.190; 5.762.965; 5.759.769; 5.756.666; 5.753.258; 5.750.373; 5.747.641; 5.747.526; 5.747.028; 5.736.320; 5.736.146; 5.733.760; 5.731.189; 5.728.385; 5.721.095; 5.716.826; 5.716.637; 5.716.613; 5.714.374; 5.709.879; 5.709.860; 5.709.843; 5.705.331; 5.703.057; 5.702.707; 5.698.178; 5.688.914; 5.686.078; 5.681.831; 5.679.784; 5.674.984; 5.672.472; 5.667.964; 5.667.783; 5.665.536; 5.665.355; 5.660.990; 5.658.745; 5.658.569; 5.643.756; 5.641.624; 5.639.854; 5.639.598; 5.637.677; 5.637.455; 5.633.234; 5.629.153; 5.627.025; 5.622.705; 5.614.413; 5.610.035; 5.607.831; 5.606.026; 5.601.819; 5.597.688; 5.593.972; 5.591.829; 5.591.823; 5.589.466; 5.587.285; 5.585.254;

ES 2 667 425 T3

5.585.250; 5.580.773; 5.580.739; 5.580.563; 5.573.916; 5.571.667; 5.569.468; 5.558.865; 5.556.745; 5.550.052; 5.543.328; 5.541.100; 5.541.057; 5.534.406; 5.529.765; 5.523.232; 5.516.895; 5.514.541; 5.510.264; 5.500.161; 5.480.967; 5.480.966; 5.470.701; 5.468.606; 5.462.852; 5.459.127; 5.449.601; 5.447.838; 5.447.837; 5.439.809; 5.439.792; 5.418.136; 5.399.501; 5.397.695; 5.391.479; 5.384.240; 5.374.519; 5.374.518; 5.374.516; 5.364.933; 5.359.046; 5.356.772; 5.354.654; 5.344.755; 5.335.673; 5.332.567; 5.320.940; 5.317.009; 5.312.902; 5.304.466; 5.296.347; 5.286.852; 5.268.265; 5.264.356; 5.264.342; 5.260.308; 5.256.767; 5.256.561; 5.252.556; 5.230.998; 5.230.887; 5.227.159; 5.225.347; 5.221.610; 5.217.861; 5.208.321; 5.206.136; 5.198.346; 5.185.147; 5.178.865; 5.173.400; 5.173.399; 5.166.050; 5.156.951; 5.135.864; 5.122.446; 5.120.662; 5.103.836; 5.100.777; 5.100.662; 5.093.230; 5.077.284; 5.070.010; 5.068.174; 5.066.782; 5.055.391; 5.043.262; 5.039.604; 5.039.522; 5.030.718; 5.030.555; 5.030.449; 5.019.387; 5.013.556; 5.008.183; 5.004.697; 4.997.772; 4.983.529; 4.983.387; 4.965.069; 4.945.082; 4.921.787; 4.918.166; 4.900.548; 4.888.290; 4.886.742; 4.885.235; 4.870.003; 4.869.903; 4.861.707; 4.853.326; 4.839.288; 4.833.072 y 4.795.739.

En otra realización, se pueden utilizar VIH o fragmentos inmunogénicos del mismo como el epítipo de VIH. Por ejemplo, son útiles para la presente invención los nucleótidos de VIH de las patentes de los Estados Unidos N.º 7.393.949, 7.374.877, 7.306.901, 7.303.754, 7.173.014, 7.122.180, 7.078.516, 7.022.814, 6.974.866, 6.958.211, 6.949.337, 6.946.254, 6.896.900, 6.887.977, 6.870.045, 6.803.187, 6.794.129, 6.773.915, 6.768.004, 6.706.268, 6.696.291, 6.692.955, 6.656.706, 6.649.409, 6.627.442, 6.610.476, 6.602.705, 6.582.920, 6.557.296, 6.531.587, 6.531.137, 6.500.623, 6.448.078, 6.429.306, 6.420.545, 6.410.013, 6.407.077, 6.395.891, 6.355.789, 6.335.158, 6.323.185, 6.316.183, 6.303.293, 6.300.056, 6.277.561, 6.270.975, 6.261.564, 6.225.045, 6.222.024, 6.194.391, 6.194.142, 6.162.631, 6.114.167, 6.114.109, 6.090.392, 6.060.587, 6.057.102, 6.054.565, 6.043.081, 6.037.165, 6.034.233, 6.033.902, 6.030.769, 6.020.123, 6.015.661, 6.010.895, 6.001.555, 5.985.661, 5.980.900, 5.972.596, 5.939.538, 5.912.338, 5.869.339, 5.866.701, 5.866.694, 5.866.320, 5.866.137, 5.864.027, 5.861.242, 5.858.785, 5.858.651, 5.849.475, 5.843.638, 5.840.480, 5.821.046, 5.801.056, 5.786.177, 5.786.145, 5.773.247, 5.770.703, 5.756.674, 5.741.706, 5.705.612, 5.693.752, 5.688.637, 5.688.511, 5.684.147, 5.665.577, 5.585.263, 5.578.715, 5.571.712, 5.567.603, 5.554.528, 5.545.726, 5.527.895, 5.527.894, 5.223.423, 5.204.259, 5.144.019, 5.051.496 y 4.942.122.

Se puede usar, en la presente invención, cualquier epítipo reconocido por un anticuerpo de VIH. Por ejemplo, son útiles para la presente invención los anticuerpos anti-VIH de las patentes de los Estados Unidos N.º 6.949.337, 6.900.010, 6.821.744, 6.768.004, 6.613.743, 6.534.312, 6.511.830, 6.489.131, 6.242.197, 6.114.143, 6.074.646, 6.063.564, 6.060.254, 5.919.457, 5.916.806, 5.871.732, 5.824.304, 5.773.247, 5.736.320, 5.637.455, 5.587.285, 5.514.541, 5.317.009, 4.983.529, 4.886.742, 4.870.003 y 4.795.739. Además, anticuerpos monoclonales anti-VIH de las patentes de los Estados Unidos N.º 7.074.556, 7.074.554, 7.070.787, 7.060.273, 7.045.130, 7.033.593, RE39.057, 7.008.622, 6.984.721, 6.972.126, 6.949.337, 6.946.465, 6.919.077, 6.916.475, 6.911.315, 6.905.680, 6.900.010, 6.825.217, 6.824.975, 6.818.392, 6.815.201, 6.812.026, 6.812.024, 6.797.811, 6.768.004, 6.703.019, 6.689.118, 6.657.050, 6.608.179, 6.600.023, 6.596.497, 6.589.748, 6.569.143, 6.548.275, 6.525.179, 6.524.582, 6.506.384, 6.498.006, 6.489.131, 6.465.173, 6.461.612, 6.458.933, 6.432.633, 6.410.318, 6.406.701, 6.395.275, 6.391.657, 6.391.635, 6.384.198, 6.376.170, 6.372.217, 6.344.545, 6.337.181, 6.329.202, 6.319.665, 6.319.500, 6.316.003, 6.312.931, 6.309.880, 6.296.807, 6.291.239, 6.261.558, 6.248.514, 6.245.331, 6.242.197, 6.241.986, 6.228.361, 6.221.580, 6.190.871, 6.177.253, 6.146.635, 6.146.627, 6.146.614, 6.143.876, 6.132.992, 6.124.132, RE36.866, 6.114.143, 6.103.238, 6.060.254, 6.039.684, 6.030.772, 6.020.468, 6.013.484, 6.008.044, 5.998.132, 5.994.515, 5.993.812, 5.985.545, 5.981.278, 5.958.765, 5.939.277, 5.928.930, 5.922.325, 5.919.457, 5.916.806, 5.914.109, 5.911.989, 5.906.936, 5.889.158, 5.876.716, 5.874.226, 5.872.012, 5.871.732, 5.866.694, 5.854.400, 5.849.583, 5.849.288, 5.840.480, 5.840.305, 5.834.599, 5.831.034, 5.827.723, 5.821.047, 5.817.767, 5.817.458, 5.804.440, 5.795.572, 5.783.670, 5.776.703, 5.773.225, 5.766.944, 5.753.503, 5.750.373, 5.747.641, 5.736.341, 5.731.189, 5.707.814, 5.702.707, 5.698.178, 5.695.927, 5.665.536, 5.658.745, 5.652.138, 5.645.836, 5.635.345, 5.618.922, 5.610.035, 5.607.847, 5.604.092, 5.601.819, 5.597.896, 5.597.688, 5.591.829, 5.558.865, 5.514.541, 5.510.264, 5.478.753, 5.374.518, 5.374.516, 5.344.755, 5.332.567, 5.300.433, 5.296.347, 5.286.852, 5.264.221, 5.260.308, 5.256.561, 5.254.457, 5.230.998, 5.227.159, 5.223.408, 5.217.895, 5.180.660, 5.173.399, 5.169.752, 5.166.050, 5.156.951, 5.140.105, 5.135.864, 5.120.640, 5.108.904, 5.104.790, 5.049.389, 5.030.718, 5.030.555, 5.004.697, 4.983.529, 4.888.290, 4.886.742 y 4.853.326, también son útiles en la presente invención.

En un ejemplo, el epítipo es un epítipo de SIV. Se entiende, por un experto en la materia, que todo lo que se refiere al VIH en la especificación también se aplica a SIV. En una realización ventajosa, el epítipo de SIV es un fragmento de proteína de la presente invención, sin embargo, la presente invención puede abarcar antígenos, epítipos o inmunógenos de SIV adicionales. Favorablemente, el epítipo de SIV es un antígeno de SIV, incluyendo, pero sin limitación, los antígenos de SIV de las patentes de los Estados Unidos N.º 7.892.729; 7.886.962; 7.879.914; 7.829.287; 7.794.998; 7.767.455; 7.759.477; 7.758.869; 7.754.420; 7.749.973; 7.748.618; 7.732.124; 7.709.606; 7.700.342; 7.700.273; 7.625.917; 7.622.124; 7.611.721; 7.608.422; 7.601.518; 7.585.675; 7.534.603; 7.511.117; 7.508.781; 7.507.417; 7.479.497; 7.464.352; 7.457.973; 7.442.551; 7.439.052; 7.419.829; 7.407.663; 7.378.515; 7.364.760; 7.312.065; 7.261.876; 7.220.554; 7.211.240; 7.198.935; 7.169.394; 7.098.201; 7.078.516; 7.070.993; 7.048.929; 7.034.010; RE39.057; 7.022.814; 7.018.638; 6.955.919; 6.933.377; 6.908.617; 6.902.929; 6.846.477; 6.818.442; 6.803.231; 6.800.281; 6.797.811; 6.790.657; 6.712.612; 6.706.729; 6.703.394; 6.682.907; 6.656.706; 6.645.956; 6.635.472; 6.596.539; 6.589.763; 6.562.571; 6.555.523; 6.555.342; 6.541.009; 6.531.574; 6.531.123; 6.503.713; 6.479.281; 6.475.718; 6.469.083; 6.468.539; 6.455.265; 6.448.390; 6.440.730; 6.423.544; 6.365.150;

6.362.000; 6.326.007; 6.322.969; 6.291.664; 6.277.601; 6.261.571; 6.255.312; 6.207.455; 6.194.142; 6.117.656; 6.111.087; 6.107.020; 6.080.846; 6.060.064; 6.046.228; 6.043.081; 6.027.731; 6.020.123; 6.017.536; 6.004.781; 5.994.515; 5.981.259; 5.961.976; 5.950.176; 5.929.222; 5.928.913; 5.912.176; 5.888.726; 5.861.243; 5.861.161; 5.858.366; 5.830.475; 5.817.316; 5.804.196; 5.786.177; 5.759.768; 5.747.324; 5.705.522; 5.705.331; 5.698.446; 5.688.914; 5.688.637; 5.654.195; 5.650.269; 5.631.154; 5.582.967; 5.552.269; 5.512.281; 5.508.166; 5.470.572; 5.312.902; 5.310.651; 5.268.265; 5.254.457; 5.212.084; 5.087.631 y 4.978.687.

Los vectores usados de acuerdo con la presente invención, se deben elegir normalmente de manera que contengan una región reguladora de genes adecuada, tal como un promotor o potenciador, de manera que se puedan expresar los antígenos de la invención.

Cuando el objetivo es expresar antígenos de la invención in vivo en un sujeto, por ejemplo, para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de VIH-1 y/o inmunidad protectora contra VIH-1, se deben elegir vectores de expresión que sean adecuados para la expresión en ese sujeto, y que sean seguros para su uso in vivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede desearse expresar los anticuerpos y/o antígenos de la invención en un animal de laboratorio, tal como para el ensayo preclínico de las composiciones inmunogénicas de VIH-1 y las vacunas de la invención. En otras realizaciones, será deseable expresar los antígenos de la invención en sujetos humanos, tal como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y la vacuna de la invención. Se pueden emplear cualquiera de los vectores que sean adecuados para tales usos y está dentro de las capacidades del experto en la materia seleccionar un vector adecuado. En algunas realizaciones, puede preferirse que los vectores usados para estas aplicaciones in vivo estén atenuados para prevenir la amplificación en el sujeto. Por ejemplo, si se usan vectores plasmídicos, preferentemente carecerán de un origen de replicación que funcione en el sujeto a fin de potenciar la seguridad para el uso in vivo en el sujeto. Si se usan vectores virales, preferentemente están atenuados o son defectuosos en la replicación en el sujeto, de nuevo, para potenciar la seguridad para el uso in vivo en el sujeto.

En realizaciones preferidas de la presente invención, se usan vectores virales. Favorablemente, el vector es un vector de CMV, que preferentemente carece, al menos, de la glucoproteína US 11.

En realizaciones preferidas, los vectores virales de la invención se administran in vivo, por ejemplo cuando el objetivo es producir una respuesta inmunogénica en un sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede desearse expresar los transgenes de la invención en un animal de laboratorio, tal como para el ensayo preclínico de las composiciones inmunogénicas de VIH-1 y las vacunas de la invención. En otras realizaciones, será deseable expresar los anticuerpos/antígenos de la invención en sujetos humanos, tal como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y la vacuna de la invención. En ciertas realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que está infectado con, o está en riesgo de infección con, HIV-1.

Para tales aplicaciones in vivo, las secuencias de nucleótidos, anticuerpos y/o antígenos de la invención se administran preferentemente como un componente de una composición inmunogénica que puede comprender las secuencias de nucleótidos y/o antígenos de la invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones inmunogénicas de la invención son útiles para estimular una respuesta inmunitaria contra VIH-1 y se pueden usar como uno o más componentes de una vacuna profiláctica o terapéutica contra VIH-1 para la prevención, mejora o tratamiento del SIDA. Los ácidos nucleicos y vectores de la invención son particularmente útiles para proporcionar vacunas genéticas, es decir, vacunas para administrar los ácidos nucleicos que codifican los antígenos de la invención a un sujeto, tal como un ser humano, de modo que los antígenos se expresan a continuación en el sujeto para provocar una respuesta inmunitaria.

Las composiciones de la invención pueden ser suspensiones inyectables, soluciones, pulverizaciones, polvos liofilizados, jarabes, elixires y similares. Se puede usar cualquier forma de composición adecuada. Para preparar tal composición, un ácido nucleico o vector de la invención, que tiene el grado de pureza deseado, se mezcla con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y excipientes también deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol o combinaciones de los mismos, tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN® PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

Una composición inmunogénica o inmunológica también se pueden formular en forma de una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua se puede basar, por ejemplo, en aceite de parafina líquido ligero (tipo Farmacopea Europea); aceite isoprenoide como escualano, escualeno, EICOSANE TM o tetraetracontano; aceite resultante de la oligomerización de alqueno(s), por ejemplo, isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes
 5 que contienen un grupo alquilo lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, por ejemplo, ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa ventajosamente en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, como los ésteres de sorbitán, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol, propilenglicol y ácido oleico,
 10 isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, como los productos Pluronic®, por ejemplo, L121. El adyuvante puede ser una mezcla de emulsionante(s), agente formador de micelas y aceite tal como el que está disponible comercialmente con el nombre de Provac® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

15 Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sustancias adicionales, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes o adyuvantes para mejorar la eficacia de las vacunas (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Company, (ed) 1980).

También pueden incluirse adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, sales minerales (por ejemplo, $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH(SO_4)_2$, sílice, alumbre, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, caolín o carbono), polinucleótidos con o sin complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (por ejemplo, Oligonucleótidos CpG, tales como aquellos descritos en Chuang, T.H. et al., (2002) *J. Leuk. Biol.* 71(3): 538-44; Ahmad-Nejad, P. et al. (2002) *Eur. J. Immunol.* 32(7): 1958-68; ácidos poli IC o poli AU, poliarginina con o sin CpG (también conocida en la técnica como IC31; véase Schellack, C. et al. (2003) *Proceedings of the 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology*; Lingnau, K. et al. (2002) *Vaccine* 20(29-30): 3498-508), JuvaVax (Patente de los Estados Unidos N.º 6.693.086), ciertas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* o miembros del género *Brucella*), flagelina (ligando del receptor 5 de tipo Toll; véase McSorley, S.J. et al. (2002) *J. Immunol.* 169(7): 3914-9), saponinas tales como QS21, QS17 y QS7 (patentes de los Estados Unidos N.º 5.057.540; 5.650.398; 6.524.584; 6.645.495), monofosforil lípido A, en particular, monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), imiquimod (también conocido en la técnica como IQM y disponible comercialmente como Aldara®); patentes de los Estados Unidos N.º 4.689.338; 5.238.944; Zuber, A.K. et al. (2004) 22(13-14): 1791-8), y el inhibidor de CCR5 CMPD167 (véase Veazey, R.S. et al. (2003) *J. Exp. Med.* 198: 1551-1562). El hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (alumbre) se usan comúnmente en una solución del 0,05 al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes que pueden usarse, especialmente con vacunas de ADN, son toxina del cólera, especialmente CTA1-DD/ISCOMs (véase Mowat, A.M. et al. (2001) *J. Immunol.* 167(6): 3398-405), polifosfocenos (Allcock, H.R. (1998) *App. Organometallic Chem.* 12(10-11): 659-666; Payne, L.G. et al. (1995) *Pharm. Biotechnol.* 6: 473-93), citoquinas tales como, pero sin limitación, IL-2, IL-4, GM-CSF, IL-12, IL-15 IGF-1, IFN- α , IFN- β y IFN- γ (Boyer et al., (2002) *J. Liposome Res.* 121:137-142; proteínas inmunorreguladoras del documento WO01/095919 tales como CD40L (ADX40; véase, por ejemplo, el documento WO03/063899) y el ligando CD1a de linfocitos citolíticos naturales (también conocido como CRONY o α -galactosil ceramida; véase Green, T.D. et al., (2003) *J. Virol.* 77(3): 2046-2055), proteínas de fusión inmunoestimuladoras tales como IL-2 fusionada al fragmento Fc de inmunoglobulinas (Barouch et al., *Science* 290: 486-492, 2000) y moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 (Boyer), todos los cuales pueden administrarse como proteínas o en forma de ADN, en los mismos vectores virales que los que codifican los antígenos de la invención o en vectores de expresión separados. Como alternativa,
 45 las vacunas de la invención se pueden proporcionar y administrar sin ningún adyuvante.

Las composiciones inmunogénicas se pueden diseñar para introducir los vectores virales en un sitio de acción deseado y liberarlo a una velocidad apropiada y controlable. Los métodos para preparar formulaciones de liberación controlada son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las preparaciones de liberación controlada se pueden producir mediante el uso de polímeros para formar complejos o absorber el inmunógeno y/o la composición inmunogénica.
 50 Se puede preparar una formulación de liberación controlada usando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, ácidos poliamino, polivinilo, pirrolidona, etilvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) que se sabe que proporcionan las características de liberación controlada o el perfil de liberación deseados. Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante una preparación de liberación controlada es incorporar los ingredientes activos en partículas de un material polimérico tal como, por ejemplo, poliésteres, ácidos poliamino, hidrogeles, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de estos ácidos o copolímeros de vinilacetato de etileno. Como alternativa, en lugar de incorporar estos ingredientes activos en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en *New Trends and Developments in Vaccines*, Voller et al. (eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1978 y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición.

65 Las dosificaciones adecuadas de los vectores virales de la invención (colectivamente, los inmunógenos) en la composición inmunogénica de la invención pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia. Por

ejemplo, la dosificación de los inmunógenos puede variar dependiendo de la vía de administración y el tamaño del sujeto. Las dosis adecuadas se pueden determinar por los expertos en la materia, por ejemplo midiendo la respuesta inmunitaria de un sujeto, tal como un animal de laboratorio, usando técnicas inmunológicas convencionales y ajustando las dosis según corresponda. Tales técnicas para medir la respuesta inmunitaria del sujeto incluyen, pero no se limitan a, ensayos de liberación de cromo, ensayos de unión a tetrámero, ensayos ELISPOT de IFN- γ , ensayos ELISPOT de IL-2, ensayos de citoquinas intracelulares y otros ensayos de detección inmunológica, por ejemplo, como se detalla en el texto "Antibodies: A Laboratory Manual" por Ed Harlow and David Lane.

Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse usando cualquier método de suministro adecuado incluyendo, pero sin limitación, suministro intramuscular, intravenoso, intradérmico, mucoso y tópico. Tales técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Ejemplos más específicos de métodos de suministro son inyección intramuscular, inyección intradérmica e inyección subcutánea. Sin embargo, el suministro no necesita limitarse a métodos de inyección.

Los programas (o regímenes) de inmunización son bien conocidos para animales (incluidos los seres humanos) y se pueden determinar fácilmente para el sujeto particular y la composición inmunogénica. Por lo tanto, los inmunógenos se pueden administrar una o más veces al sujeto. Preferentemente, hay un intervalo de tiempo establecido entre administraciones separadas de la composición inmunogénica. Si bien este intervalo varía para cada sujeto, generalmente oscila entre 10 días y varias semanas, y suele ser de 2, 4, 6 u 8 semanas. Para los seres humanos, el intervalo es normalmente de 2 a 6 semanas. En una realización particularmente ventajosa de la presente invención, el intervalo es más largo, ventajosamente aproximadamente 10 semanas, 12 semanas, 14 semanas, 16 semanas, 18 semanas, 20 semanas, 22 semanas, 24 semanas, 26 semanas, 28 semanas, 30 semanas, 32 semanas, 34 semanas, 36 semanas, 38 semanas, 40 semanas, 42 semanas, 44 semanas, 46 semanas, 48 semanas, 50 semanas, 52 semanas, 54 semanas, 56 semanas, 58 semanas, 60 semanas, 62 semanas, 64 semanas, 66 semanas, 68 semanas o 70 semanas.

Los regímenes de inmunización normalmente tienen de 1 a 6 administraciones de la composición inmunogénica, pero pueden tener tan solo una o dos o cuatro. Los métodos para inducir una respuesta inmunitaria también pueden incluir la administración de un adyuvante con los inmunógenos. En algunos casos, la inmunización de refuerzo anual, bianual u otro intervalo largo (5-10 años) puede complementar el protocolo de inmunización inicial.

Los presentes métodos también incluyen una variedad de regímenes de primovacunación-refuerzo, por ejemplo, regímenes de refuerzo de Adenovirus-sensibilizador de ADN. En estos métodos, una o más inmunizaciones de sensibilización son seguidas por una o más inmunizaciones de refuerzo. La composición inmunogénica real puede ser la misma o diferente para cada inmunización y también se pueden variar el tipo de composición inmunogénica (por ejemplo, conteniendo proteína o vector de expresión), la vía y la formulación de los inmunógenos. Por ejemplo, si se usa un vector de expresión para los pasos de sensibilización y refuerzo, puede ser del mismo o de diferente tipo (por ejemplo, ADN o vector de expresión bacteriano o viral). Un régimen útil de primovacunación-refuerzo proporciona dos inmunizaciones de sensibilización, con cuatro semanas de diferencia, seguidas de dos inmunizaciones de refuerzo a las 4 y 8 semanas después de la última inmunización de sensibilización. También debería ser fácilmente evidente para un experto en la materia, que existen varias permutaciones y combinaciones que se abarcan usando los vectores de expresión de ADN, bacterianos y virales de la invención para proporcionar regímenes de sensibilización y refuerzo. En el caso de que los vectores virales expresen US2-11 o algunos de los genes codificados en la región US2-11, se pueden usar de manera repetida mientras expresan diferentes antígenos derivados de diferentes patógenos.

Una realización específica de la invención proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un sujeto mediante la administración de una composición inmunogénica de la invención, preferentemente un vector de CMV con una mutación deletérea en, al menos, US 11 que codifica uno o más de los epítomos de la invención, una o más veces a un sujeto en el que los epítomos se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria específica en el sujeto. Tales inmunizaciones pueden repetirse múltiples veces a intervalos de tiempo de al menos 2, 4 o 6 semanas (o más) de acuerdo con un régimen de inmunización deseado.

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar solas, o se pueden administrar conjuntamente, o administrar secuencialmente, con otros antígenos, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o vacunas o terapéuticas proporcionando, de este modo, composiciones multivalentes o de "cóctel" o de combinación de la invención y métodos para emplearlos. De nuevo, los ingredientes y la forma (secuencial o administración conjunta) de administración, así como las dosis se pueden determinar teniendo en cuenta factores tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del paciente particular y la vía de administración.

Cuando se usan en combinación, los otros antígenos se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes como parte de un régimen global de inmunización, por ejemplo, como parte de un régimen de primovacunación-refuerzo u otro protocolo de inmunización. En una realización ventajosa, el otro inmunógeno del VIH es env, preferentemente el trímero env del VIH.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vectores de citomegalovirus recombinantes con inmunogenicidad mejorada

5 Durante el curso de la evaluación de la inmunogenicidad del vector de CMV/SIV de macaco rhesus (Rh), los epítomos de SIV que previamente se había mostrado que representaban dianas dominantes de los linfocitos T CD8+ en macacos Rhesus infectados con SIV o vacunados con vector de ADN/adenovirus/pox no fueron dianas en absoluto de las respuestas de linfocitos T CD8 + provocadas por vector de RhCMV/SIV (por ICS o tinción de tetrámero). Estos incluyeron 9 epítomos restringidos a Mamu A*01 en 12 animales; 3 epítomos a Mamu A*02 en 4
10 animales, 1 epítomo a B*08 en 1 animal y 3 epítomos a Mamu B*17 en 7 animales (Figura 1; izquierda). CMVH y RhCMV expresan 4 glucoproteínas relacionadas - US2/Rh182, US3/Rh184, US6/Rh185 y US11/Rh189 que actúan conjuntamente con una eficacia muy alta para inhibir la presentación de epítomos restringidos a MHC de clase I por células infectadas, Powers C et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 333-359 (2008); Liu Z et al., *Int J Biochem Cell Biol* 41.503-506 (2009); van der Wal, FJ et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 269, 37-55 (2002); Hewitt EW et al.,
15 *EMBO J* 20, 387-396 (2001).

La región US2-11 de CMV se muestra en la Figura 3. Los solicitantes han generado un vector que puede comprender una delección que abarca los genes US2, US3 y US6 (Δ US2-6) y otro que puede comprender una delección de US8, US10 y US11 (Δ US8-11). Cada vector puede generarse por mutagénesis de BAC, como se describe en Hansen SG et al., 2010 citado anteriormente. Otras construcciones pueden comprender SIVgag, SIVenv, SIVrtnef (rtn), SIVpol u otros antígenos exógenos virales, bacterianos, parasitarios o derivados del cáncer en lugar de US2-US6 o US8-11. Construcciones adicionales incluyen mutaciones individuales y/o delecciones de US2, US3, US6, US8, US10 o US11 con el resto de US2-11 intacto. Tales construcciones pueden además incluir antígenos exógenos.

25

Ejemplo 2 - Construcción y caracterización de RhCMV Δ US2-6 y RhCMV Δ US8-11

Los vectores Rh186-189 (Δ US8-11) y Rh182-185 (Δ US2-6) se generaron mediante recombinación de BAC. La recombinación de BAC comienza con la recombinación en *E. coli* entre la cepa 68-1 BAC de RhCMV y un producto de PCR que contiene el marcador SIV gag o SIVrtnef y un casete resistente a la kanamicina (KanR). El casete KanR está flanqueado por sitios FRT y los extremos del producto de PCR incluyen entre 40 y 60 pares de bases de homología con el ORF a eliminar. Los recombinantes se seleccionan con kanamicina y a continuación se someten a recombinación inducida por arabinosa de los sitios FRT para eliminar el casete KanR. Por lo tanto, solamente un marcador gag/rtn y una única marca FRT permanecen en lugar del ORF eliminado. Este producto BAC final se somete a electroporación en fibroblastos rhesus, a partir de los cuales se cosecha el virus recombinante. Los virus producidos por este método e incluidos en este estudio se representan en diagrama en las Figs. 4A y 4B.

Todos los virus fueron caracterizados minuciosamente in vitro. Todos los BAC recombinantes se rastrearon mediante digestión de restricción para mostrar un genoma viral intacto. Los BAC también se cribaron mediante PCR para garantizar que se eliminaran los ORF correctos. Una vez que los virus se habían reconstituido a partir del cultivo celular, se analizaron sus perfiles de expresión génica, expresión de marcador de proteína de SIV y cinética de crecimiento. La RT-PCR semicuantitativa confirmó que la estrategia de inactivación había eliminado los ORF apropiados sin afectar a las transcripciones circundantes o los controles celulares GAPDH o β -actina (Figura 5A). Además, La transferencia Western del lisado celular infectado confirmó la expresión de SIVgag o SIVrtnef (marcados con Flag o V5, respectivamente). Todos los lisados celulares infectados expresaron la proteína viral IE-1 o IE-2 (Figura 5B).

RhCMV que carece de homólogos de US8-11 de CMVH causa superinfección y provoca respuestas inmunodominantes específicas de gag. Los solicitantes infectaron dos macacos rhesus (MR) RhCMV seropositivos Mamu A*01 con un virus que contenía una delección dirigida dentro de la región Rh182-189 que carecía de los ORF Rh186-Rh189 (correspondiente a CMVH US8-11) pero contenía el antígeno exógeno SIVgag dirigido por el promotor EF1 α (Δ US8-11gag) (Figuras 4A y 4B). Este virus todavía contiene la mayoría de los inhibidores de MHC-I, incluyendo homólogos a US2, US3 y US6 de CMVH. El Δ US8-11gag fue capaz de superar la inmunidad preexistente a RhCMV y superinfectar a ambos MR Mamu A*01, como se determinó mediante citometría de flujo multiparámetro de PBMC y BAL recogido de los dos animales (Figura 6A). Además, ambos animales desarrollaron respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de SIVgag en PBMC y BAL dentro de las 2 semanas siguientes a la inoculación de Δ US8-11gag (FIG. 6B). Las respuestas de los linfocitos T específicas de SIVgag se midieron usando un grupo de péptidos solapantes. Increíblemente, ambos MR desarrollaron las mismas respuestas inmunodominantes de SIVgag restringido a Mamu A*01 vistas con Δ US2-11gag (Figuras 1 y 6C). Estos datos muestran que los vectores delecionados con US8-11 pueden superinfectar pero también inducen los linfocitos T contra epítomos inmunodominantes.

60

Ejemplo 3: los vectores de CMV que carecen de US8-11 son capaces de superinfectar a macacos rhesus (MR) positivos para CMV y los vectores CMV/SIV que carecen de US8-11 inducen una respuesta de linfocitos T CD8+ a largo plazo a epítomos inmunodominantes de SIV típicos

5 Se inocularon cuatro MR positivos para CMV por vía subcutánea con 10^7 unidades formadoras de placas (UFP) de vector recombinante Δ US8-11RhCMV/rt y Δ US8-11RhCMV/gag. Se recogió sangre o BAL en los días indicados y se analizaron en el mismo día las respuestas de linfocitos T. En la fig. 7A, frecuencias de respuesta de linfocitos T CD8+ a los antígenos de SIV, SIVgag y SIVrt (fusión de rev-tat-nef) determinadas por análisis de citometría de flujo de tinción de citoquinas intracelulares para linfocitos T CD8+ y los marcadores de activación CD69, TNF- α e IFN- γ después de la estimulación de PBMC con péptidos superpuestos que cubren los antígenos de SIV. El porcentaje de los linfocitos T específicos de SIVrt o SIVgag que responden dentro del subconjunto de memoria total en las fracciones de sangre (izquierda) y BAL (derecha), se muestran, para cada punto de tiempo, como la media de los cuatro MR (+/- SEM). El desarrollo y la persistencia de las respuestas de los linfocitos T contra SIVrt y SIVgag indican la capacidad de los vectores con US8-11 eliminados para superinfectar MR CMV+. En la fig. 7B, frecuencias de respuesta de linfocitos T CD8+ a los epítomos restringidos a Mamu A*01 inmunodominantes SIVtat(SL8) y SIVgag(CM9) determinadas por análisis de citometría de flujo de tinción de citoquinas intracelulares para linfocitos T CD8+ y los marcadores de activación CD69, TNF- α e IFN- γ después de la estimulación de PBMC con péptidos 9 meros SL8 y CM9. El porcentaje de los linfocitos T específicos de SIVtat (SL8) o SIVgag (CM9) que responden dentro del subconjunto de memoria global en las fracciones de sangre (izquierda) y BAL (derecha) se muestran, para cada punto de tiempo, como la media de los cuatro MR (+/- SEM). El desarrollo de respuestas de linfocitos T frente a epítomos inmunodominantes tatSL8 y gagCM9 indica la capacidad de vectores con US8-11 eliminados de provocar respuestas de linfocitos T CD8+ a epítomos inmunodominantes que no están dirigidos a respuestas de linfocitos T CD8+ por vectores que expresan RhCMVrt o RhCMgag de tipo salvaje.

Ejemplo 4: los vectores de CMV que carecen de US2-6 son capaces de superinfectar a macacos rhesus (MR) positivos para CMV pero no inducen una respuesta de linfocitos T CD8+ a epítomos de SIV inmunodominantes típicos.

30 Se inocularon cuatro MR positivos para CMV por vía subcutánea con 10^7 unidades formadoras de placas (UFP) de vector recombinante Δ US2-6RhCMV/rt y Δ US2-6RhCMV/gag. Se recogió sangre o BAL en los días indicados y se analizaron en el mismo día las respuestas de linfocitos T. En la fig. 8A, frecuencias de respuesta de linfocitos T CD8+ a los antígenos de SIV, SIVgag y SIVrt (fusión de rev-tat-nef) determinadas por análisis de citometría de flujo de tinción de citoquinas intracelulares para linfocitos T CD8+ y los marcadores de activación CD69, TNF- α e IFN- γ después de la estimulación de PBMC con péptidos superpuestos que cubren los antígenos de SIV. El porcentaje de los linfocitos T específicos de SIVrt o SIVgag que responden dentro del subconjunto de memoria global en las fracciones de sangre (izquierda) y BAL (derecha) se muestran, para cada punto de tiempo, como la media de los cuatro MR (+/- SEM). El desarrollo y la persistencia de las respuestas de los linfocitos T contra SIVrt y SIVgag indican la capacidad de los vectores con US2-6 eliminados para superinfectar MR CMV+. En la fig. 7B, frecuencias de respuesta de linfocitos T CD8+ a los epítomos restringidos a Mamu A*01 inmunodominantes SIVtat(SL8) y SIVgag(CM9) determinadas por análisis de citometría de flujo de tinción de citoquinas intracelulares para linfocitos T CD8+ y los marcadores de activación CD69, TNF- α e IFN- γ después de la estimulación de PBMC con péptidos 9 meros SL8 y CM9. El porcentaje de los linfocitos T específicos de SIVtat (SL8) o SIVgag (CM9) que responden dentro del subconjunto de memoria global en las fracciones de sangre (izquierda) y BAL (derecha) se muestran, para cada punto de tiempo, como la media de los cuatro MR (+/- SEM). La falta de respuestas de linfocitos T contra los epítomos inmunodominantes tatSL8 y gagCM9 indica que los vectores con US2-6 eliminados son incapaces de inducir respuestas de linfocitos T CD8+ a epítomos inmunodominantes similares a los vectores que expresan RhCMVrt o RhCMgag de tipo salvaje.

Ejemplo 5 - Deleción de Rh189 (US11) por inserción de gag en RhCMV-retanef

50 La fig. 9A muestra una representación esquemática de la construcción RTN Δ 189gag. El inhibidor de la presentación de antígeno Rh189 (US11) se eliminó mediante la inserción de un SIVgag sin promotor. SIVretanef se insertó entre Rh213 y 214 y está dirigido por el promotor EF1 α como se describe (Hansen y col., Nat. Med. 2009).

55 La fig. 9B muestra una verificación de la deleción de Rh189 y la inserción de SIVgag mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los lisados de fibroblastos rhesus no infectados o infectados con los virus indicados se sometieron a PCR usando cebadores específicos para los insertos indicados. Obsérvese que construir RTN Δ Rh189gag no produce un fragmento de ADN específico de Rh189, solo bandas no específicas también encontradas en células no infectadas. Por el contrario, el tratamiento para SIVgag o para el marco de lectura abierto vecino Rh190 da como resultado un producto de PCR específico.

60 La fig. 9C muestra una inmunotransferencia para SIVretanef. Los lisados de fibroblastos infectados con los virus indicados se separaron mediante SDS-PAGE y, después de la transferencia sobre membranas de inmunotransferencia, se trataron con un anticuerpo contra el epítomo V5 que está fusionado con la proteína de fusión rev-tat-nef (rtn) de SIV. Obsérvese que solamente en los virus que expresan SIVrt se detecta la respectiva proteína.

Ejemplo 6- Fig. 10: RhCMV que carece de Rh189 (US11) es capaz de superinfectar animales CMV + e induce una respuesta inmunitaria contra epítomos de SIV inmunodominantes.

5 Se inocularon cuatro MR positivos para CMV por vía subcutánea con 10^7 unidades formadoras de placas (UFP) de vector recombinante Rh-CMV/RTNΔ189gag. La Figura muestra las frecuencias de respuestas de linfocitos T CD8+ a péptidos solapantes de SIVrtn, una fusión de rev/tat y nef o frente al epítomo inmunodominante SL8 restringido a Mamu A*01 de SIVtat como se determina mediante análisis de citometría de flujo de tinción de citocinas intracelulares para linfocitos T CD8+ y los marcadores de activación TNF- α e IFN- γ después de la estimulación de linfocitos T de sangre periférica (paneles superiores) y BAL (paneles inferiores) con péptidos. Se representan linfocitos T de un MR representativo que responde a SIVrtn (paneles de la izquierda) o SIVtat (SL8) (paneles de la derecha). Los cuadrantes superior e inferior derecho de los perfiles citométricos de flujo indican el porcentaje neto de la población total de linfocitos T CD8 + que responde al antígeno designado con producción de TNF e IFN- γ como de TNF solo, respectivamente.

15 LISTADO DE SECUENCIAS**Proteína US2 - SEQ ID NO: 1**

1 mnnlwkwavg lwtsmgplir lpdgitkage dalrpwksta khpwfqiedn rcyidngklf
 61 argshivgnms rfvfdpkady ggvgenlyvh addvefvpgge slkwnvrnld vmpifetlal
 121 rlvlggdviw lrcvpelrvd ytssaymwnm qygmvrksyt hvawtivfys initllvlfi
 181 vyvtvdcnls mmwמרffvc

20

Proteína US3 - SEQ ID NO: 2

1 mkpvvlvlail avlflrlads vprpldvvs eirsahfrve enqcwfhmgm lhykgrmsgn
 61 ftekhfvsvg ivsqsymdrl qvsgeqyhhd ergayfewni gghvphtvd mvditlstrw
 121 gdpkkyaacv pqvrmdyssq tinwylqrsi rddnwgllfr tllvylfslv vlvlltvgs
 181 arlrfi

25 Proteína US6 - SEQ ID NO: 3

1 mdllirlgfl lmcaltptge rssrdpitll slsprqqacv prtksyrpvc yndtgdctda
 61 ddswkqlsed fahqclqaak krpkthksrp ndrnlgrlt cqrvsrllpc dldihpshrl
 121 ltlmndevcd gavwnafrli erhgffavtl ylccgitllv vilallcsit yestgrgirr
 181 cgs

30

Proteína US11 - SEQ ID NO: 4

1 mnlvmlilal wapvagsmpe lsltlfdepp plvetepplp lpdvseyrve ssearcvlrs
 61 ggrlealwtl rgnlsvptpt prvyqtleg yadvptpve dvseslvakr ywlrdyrvpq
 121 rtklvlfyfs pchqcqyyv eceprclvpw vplwssledi erllfedrrl mayyaltiks
 181 aqytlmmvav iqvfwglyvk gwllhrhfpwm fsdqw

REIVINDICACIONES

1. Un vector de citomegalovirus (CMV) para su uso en un método para inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ a un antígeno heterólogo en un sujeto seropositivo para CMV,
5 en donde el vector de CMV es:
- (a) un vector de CMV humano (CMVH) que codifica un antígeno heterólogo y proteínas US2-US6 funcionales y no expresa una proteína US11 activa, o
10 (b) un vector de CMV de rhesus (RhCMV) que codifica un antígeno heterólogo y proteínas funcionales Rh182-Rh185 y no expresa una proteína Rh189 activa; y
- en el que el antígeno heterólogo es un antígeno de enfermedad infecciosa o un antígeno tumoral.
2. El vector de CMV para el uso de la reivindicación 1, en el que el antígeno heterólogo se selecciona del grupo que
15 consiste en: un antígeno de Morbillivirus; un antígeno del virus HA del sarampión; un antígeno del virus F del sarampión; una glucoproteína de la rabia; un antígeno de la glucoproteína G del virus de la rabia; un antígeno de la gripe; un antígeno del virus HA de la gripe; un antígeno del virus N de la gripe; un antígeno de Herpesvirus; un antígeno de glucoproteínas del virus del herpes simple (HSV); un antígeno del virus de Epstein-Barr; un antígeno de flavivirus; un antígeno de VEJ; un antígeno del virus de la Fiebre Amarilla; un antígeno del virus del Dengue; un
20 antígeno del virus de la Hepatitis; HBsAg; un antígeno del virus de la inmunodeficiencia; un antígeno del virus Hantaan; un antígeno de C. tetani; un antígeno de las paperas; un antígeno neumocócico; PspA; un antígeno de Borrelia; OspA, OspB y OspC de Borrelia asociados con la enfermedad de Lyme tal como Borrelia burgdorferi, Borrelia atzelli y Borrelia garinii; un antígeno de la varicela (varicella zoster); o un antígeno de un Plasmodium.
3. El vector de CMV para el uso de la reivindicación 1, en el que el antígeno heterólogo se selecciona del grupo que
25 consiste en: un antígeno de VIH gag, un antígeno de VIH env, un antígeno de VIH rev, un antígeno de VIH gag, un antígeno de VIH Nef, un antígeno de VIH pol y un antígeno de VIH int.
4. El vector de CMV para el uso de la reivindicación 1, en el que el antígeno heterólogo se selecciona del grupo que
30 consiste en: un antígeno de SIV gag, un antígeno de SIV env, un antígeno de SIV rev, un antígeno de SIV tat, un antígeno de SIV nef, un antígeno de SIV pol y un antígeno de SIV int.
5. El vector de CMV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto seropositivo para
35 CMV es un ser humano o un macaco rhesus.
6. El vector de CMV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el vector de CMV comprende una o más mutaciones puntuales en una secuencia de ácido nucleico que codifica US 11, una mutación de cambio de marco en la secuencia de ácido nucleico que codifica US 11, una delección de toda o parte de la
40 secuencia de ácido nucleico que codifica US11 o una construcción no codificante o de ARNi que inhibe la expresión de US 11 como se representa en la SEQ ID NO: 4.
7. El vector de CMV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el vector de CMV se administra por administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal u oral.
8. El vector de CMV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la expresión del antígeno
45 heterólogo está dirigida por una secuencia que codifica un antígeno heterólogo operativamente unida a un promotor.
9. El vector de CMV para el uso de la reivindicación 8, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor no viral o un promotor viral.
50
10. El vector de CMV para el uso de la reivindicación 8, en el que el promotor es un promotor EF1-alfa, MCMV-IE, HCMV-IE.
11. El vector de CMV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el vector de CMV codifica
55 US2 como se representa en la SEQ ID NO:1, US3 como se representa en la SEQ ID NO:2 y US6 como se representa en la SEQ ID NO:3.

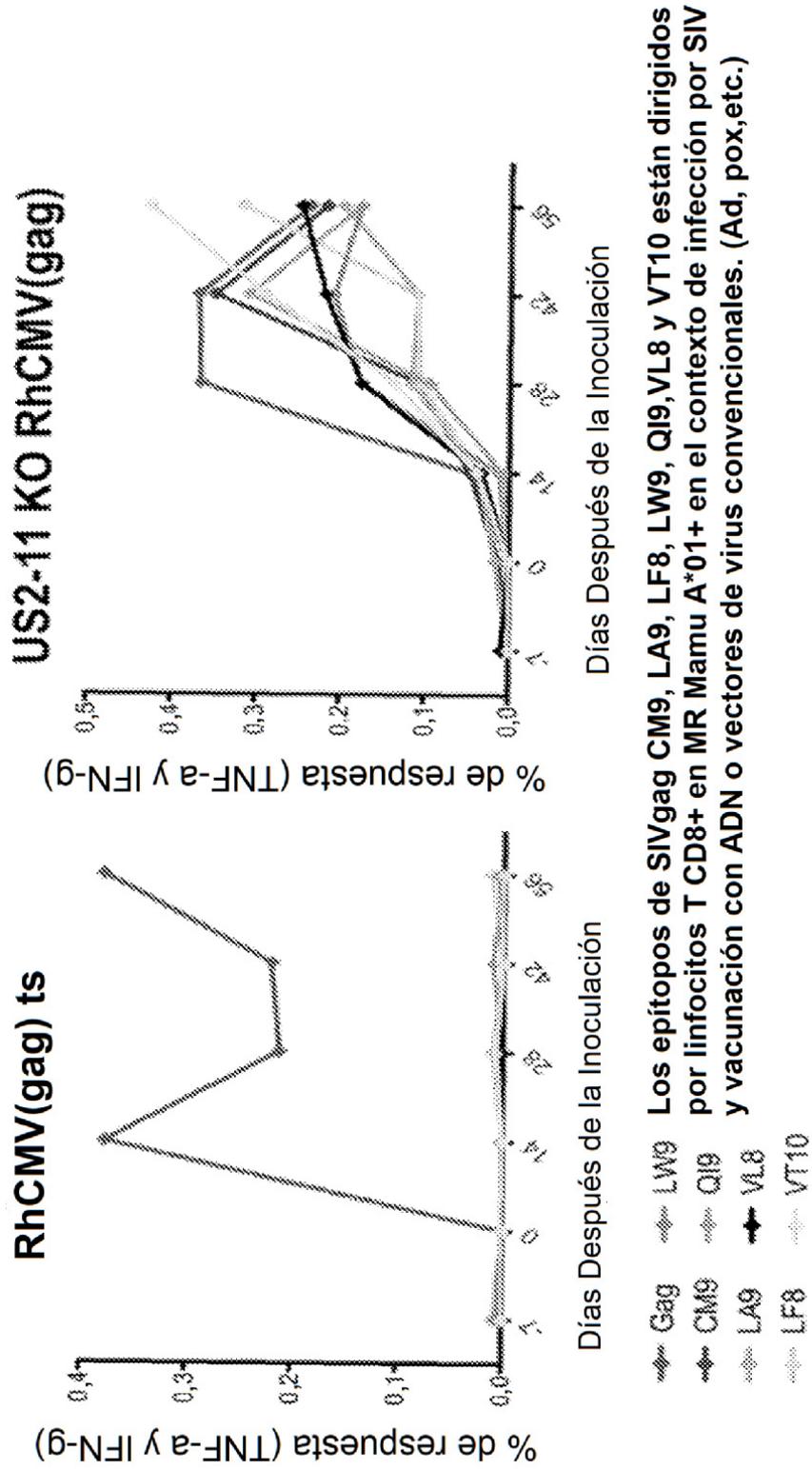
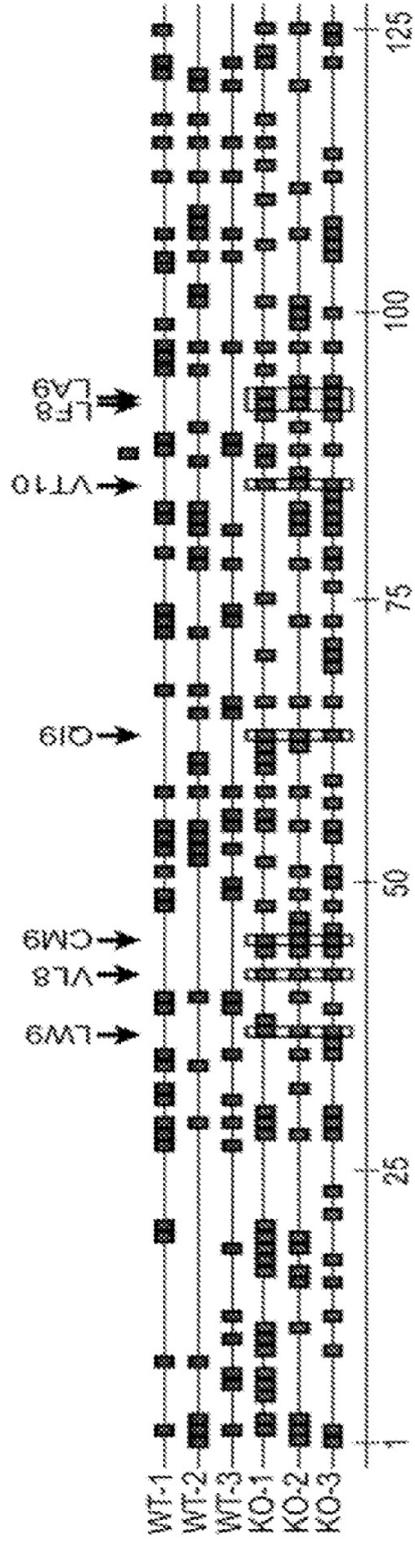


FIG. 1



SIVmac239 Gag 15 meros individual (superposición de 4 a.a)

FIG. 2

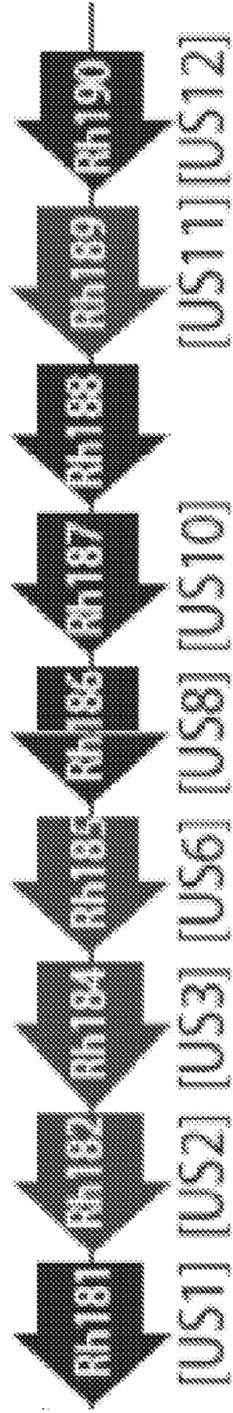


FIG. 3

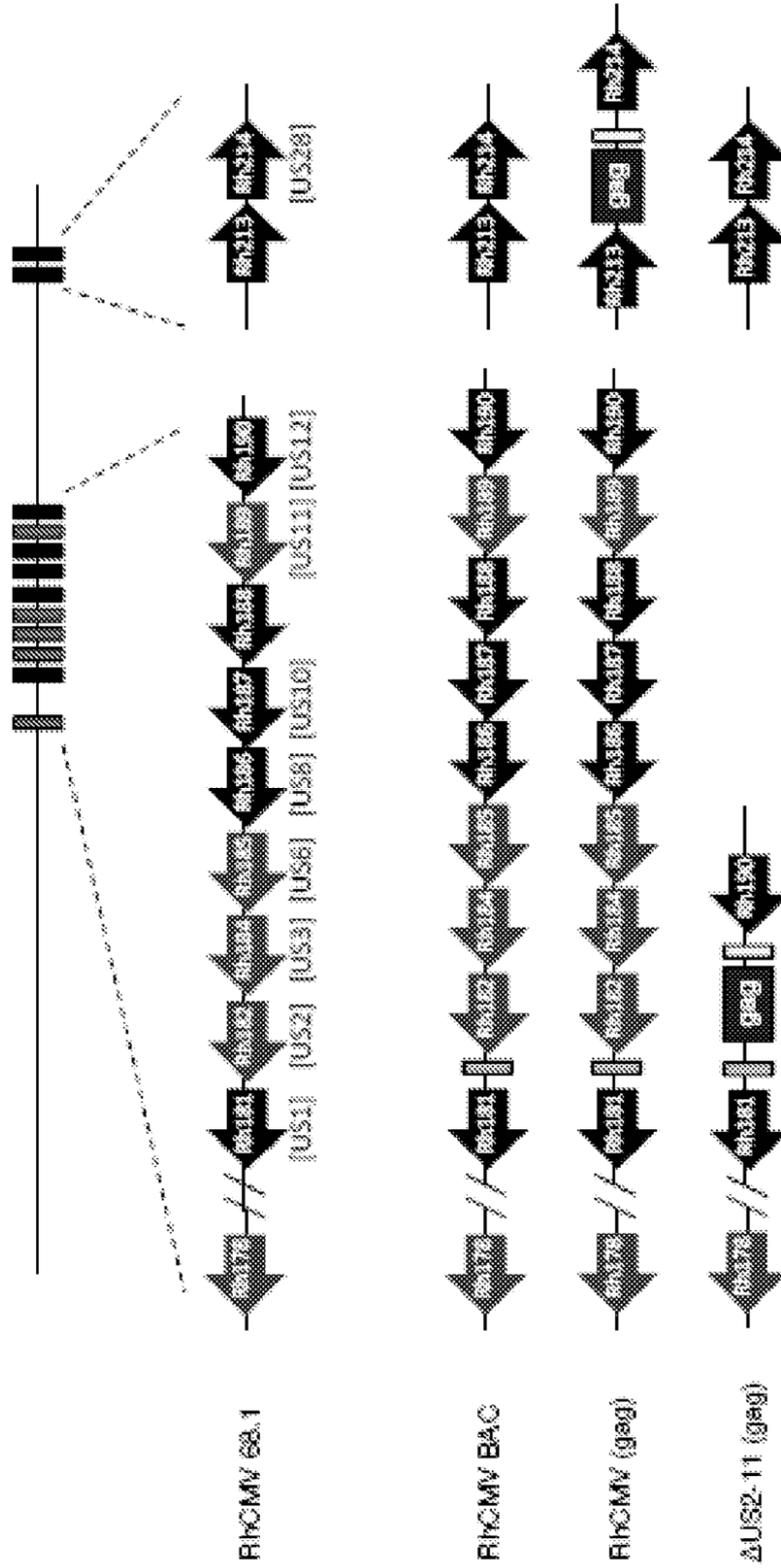


FIG. 4A

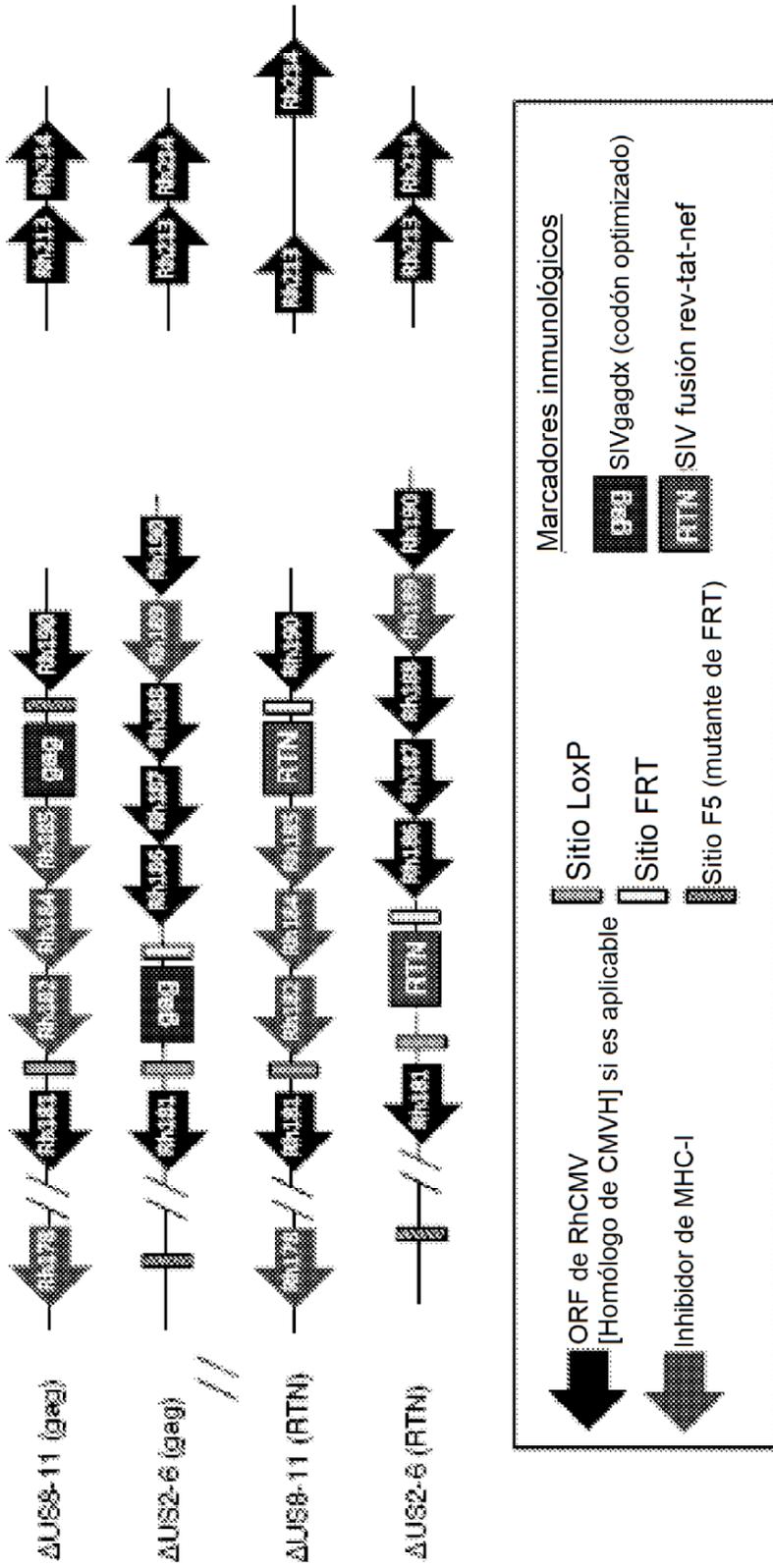


FIG. 4B

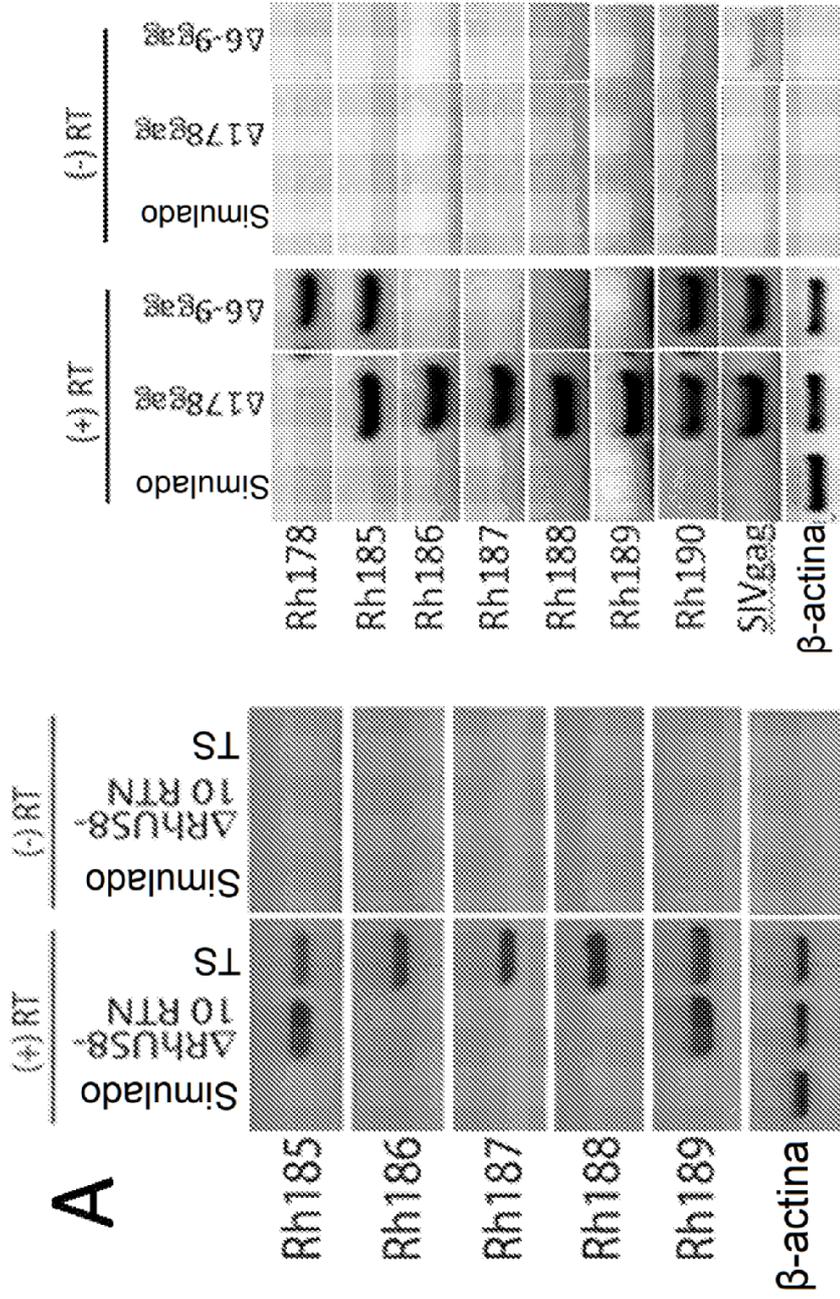


FIG. 5A

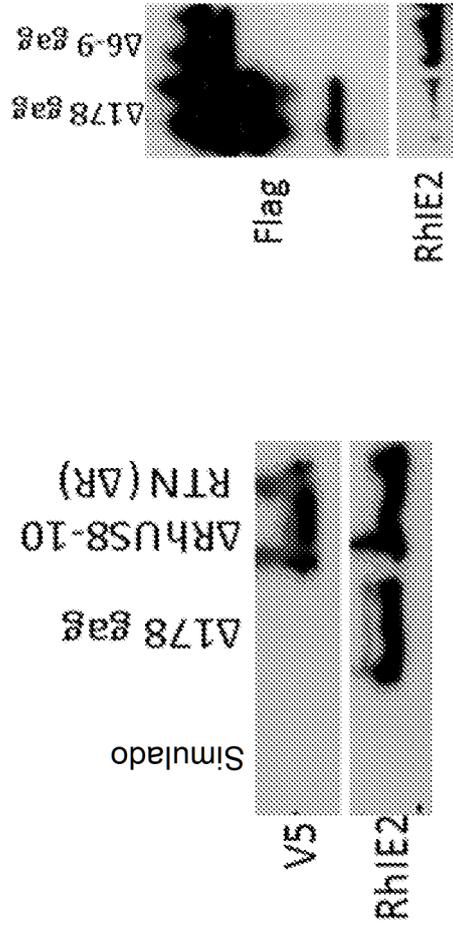


FIG. 5B

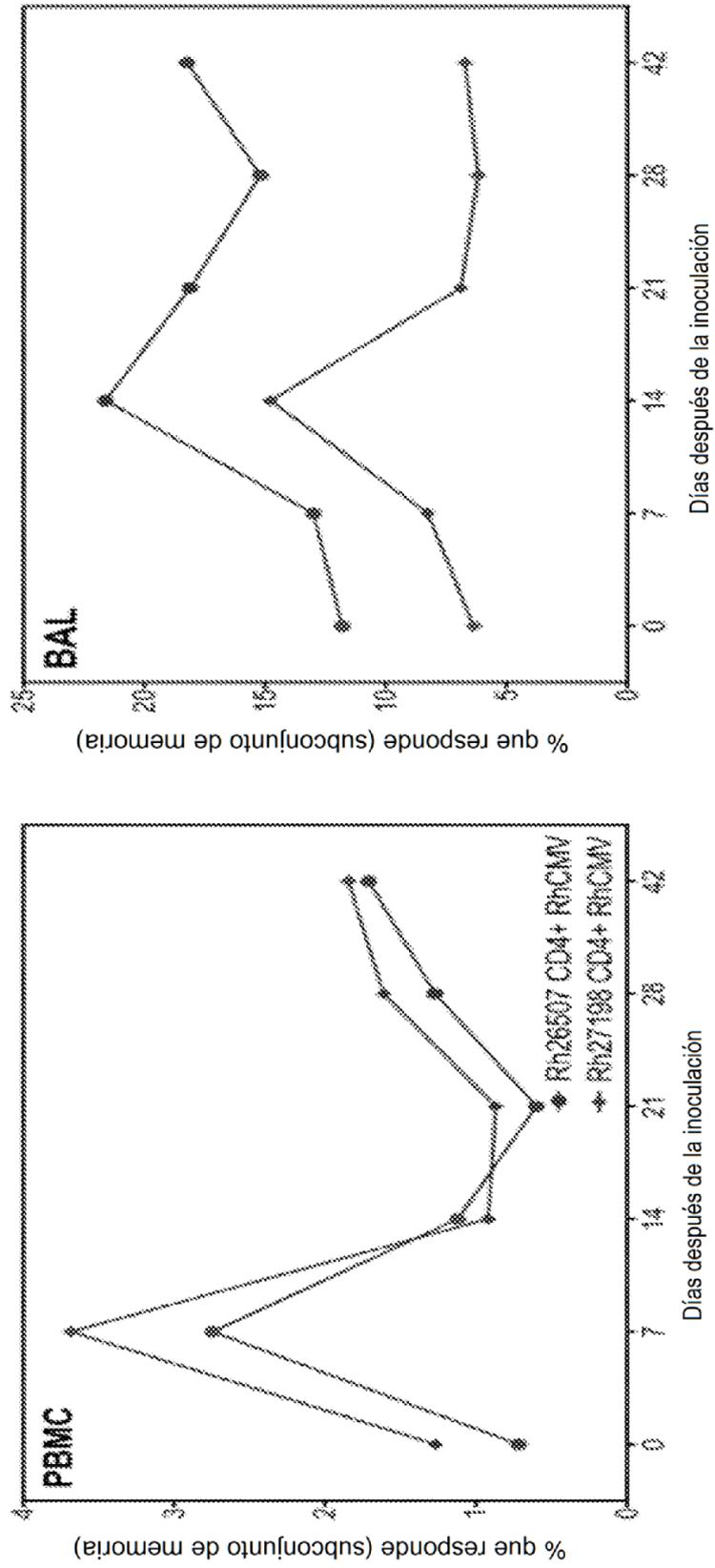


FIG. 6A

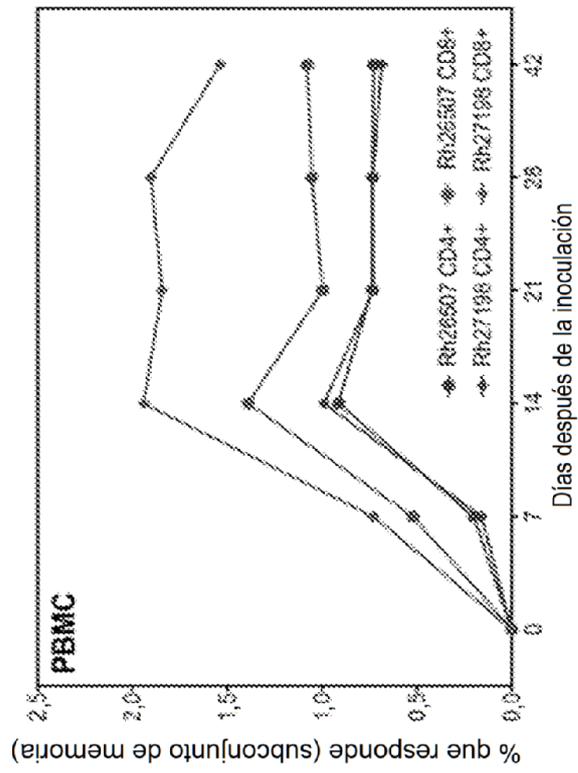
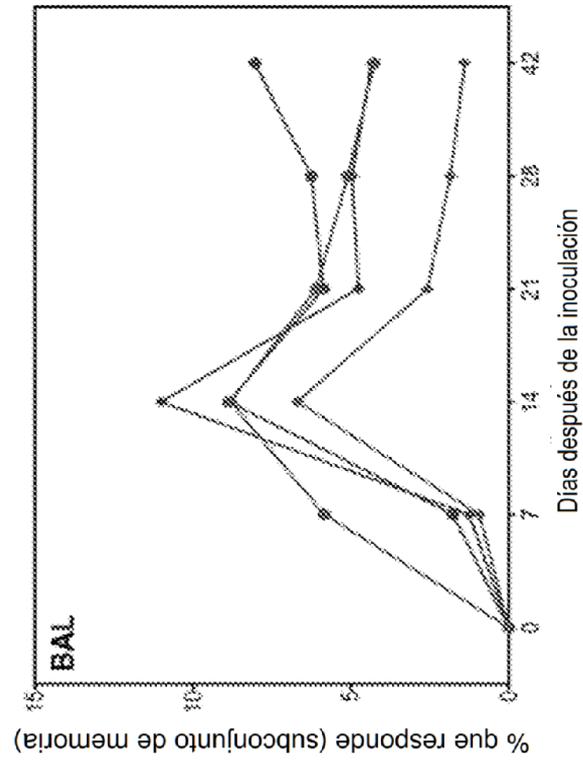


FIG. 6B

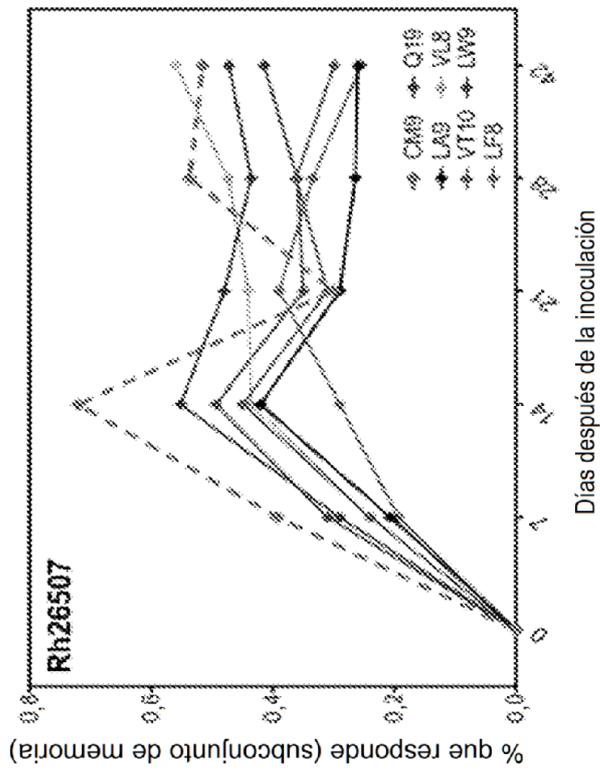
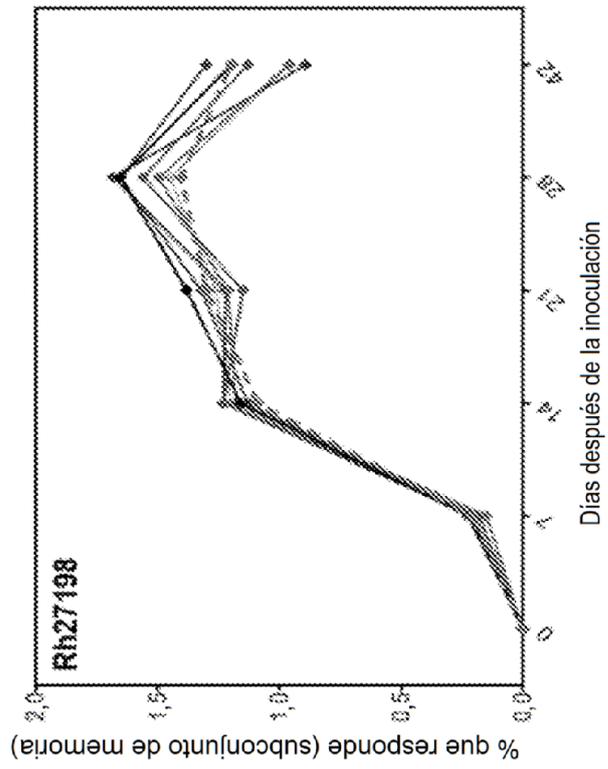


FIG. 6C

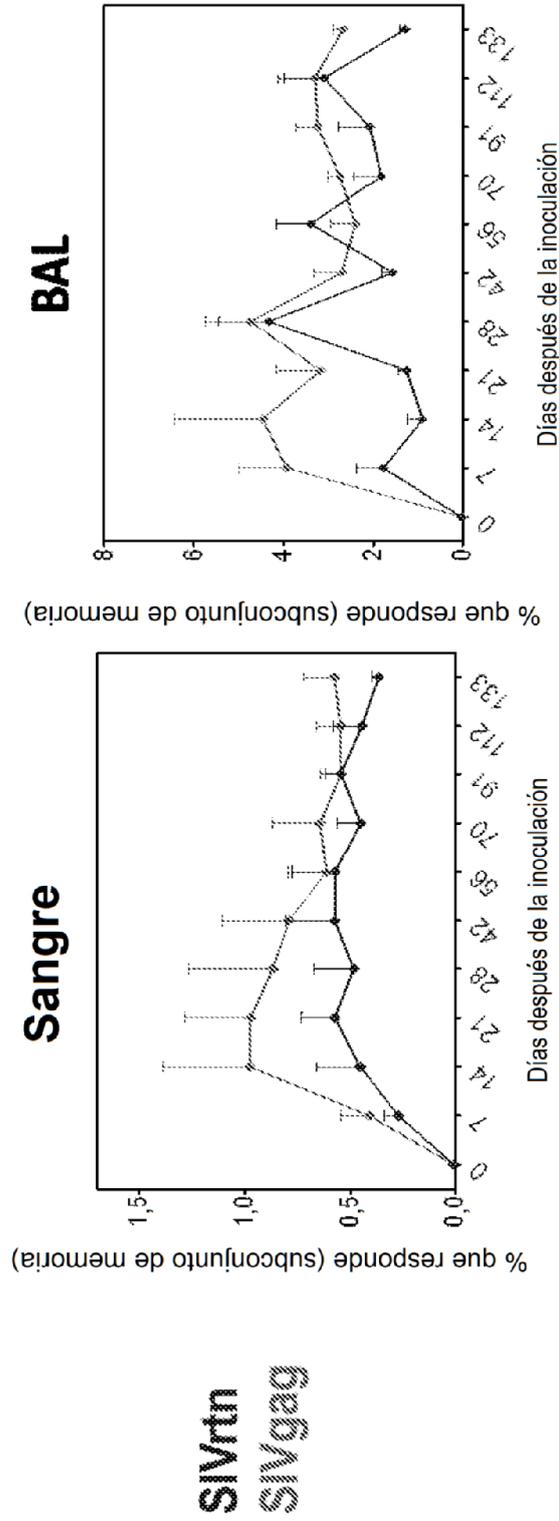


FIG. 7A

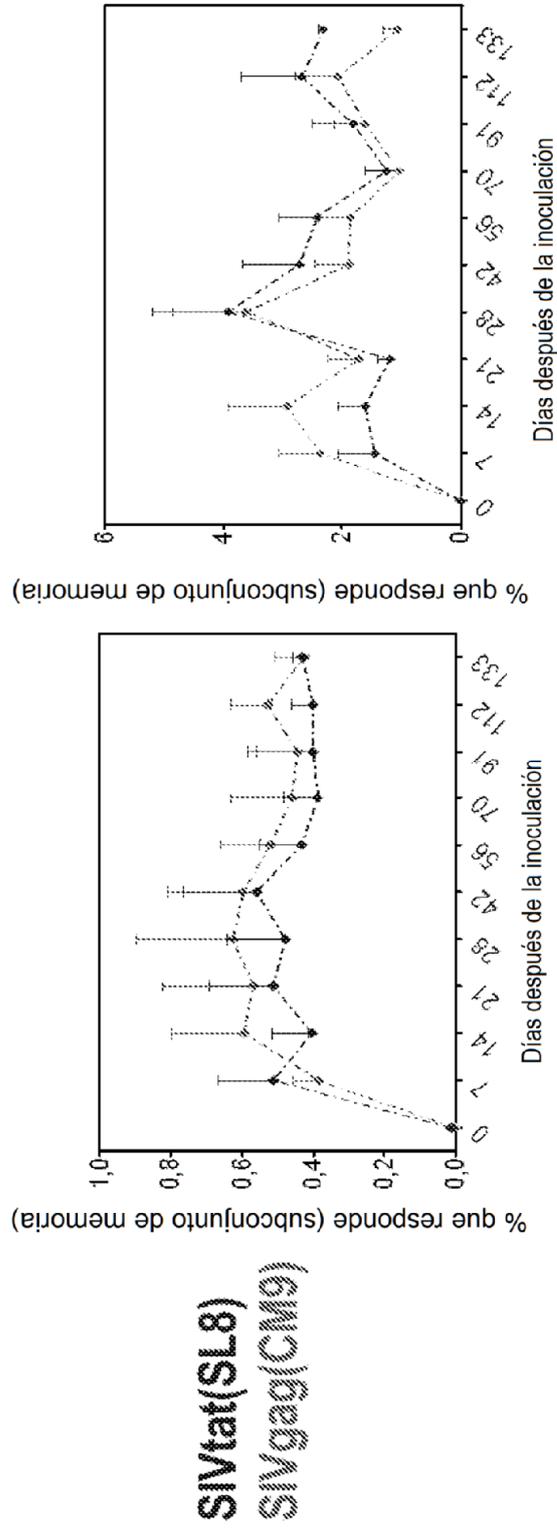
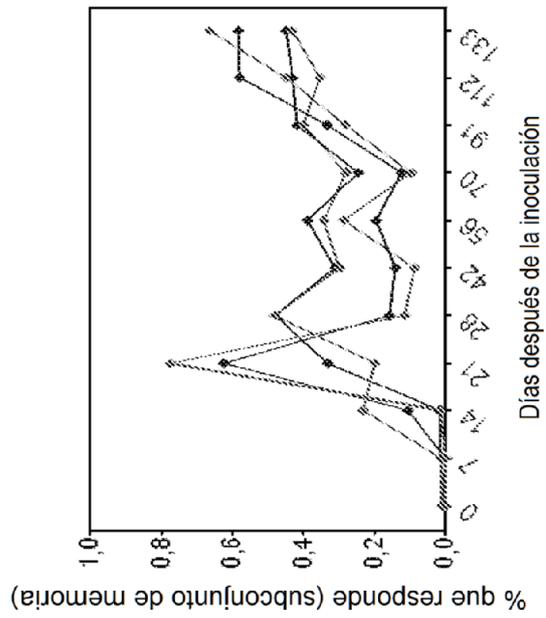
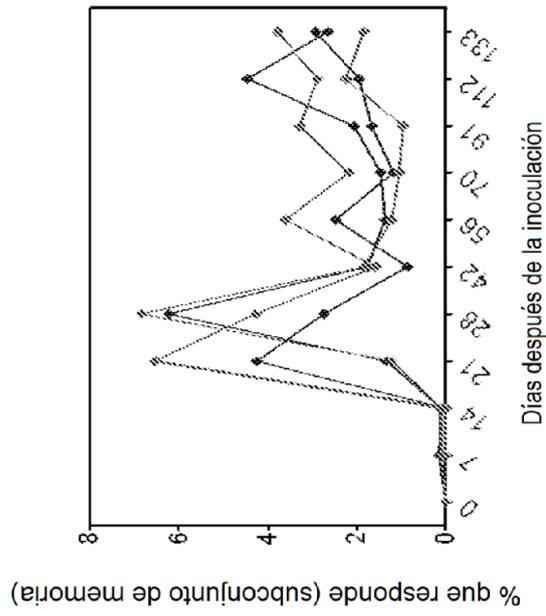
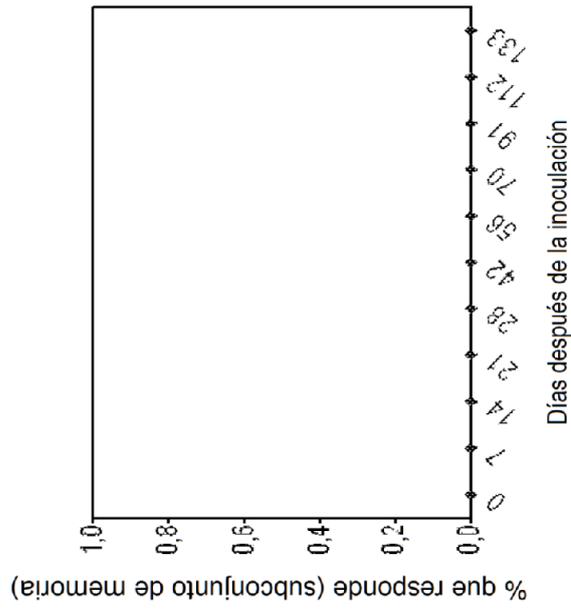
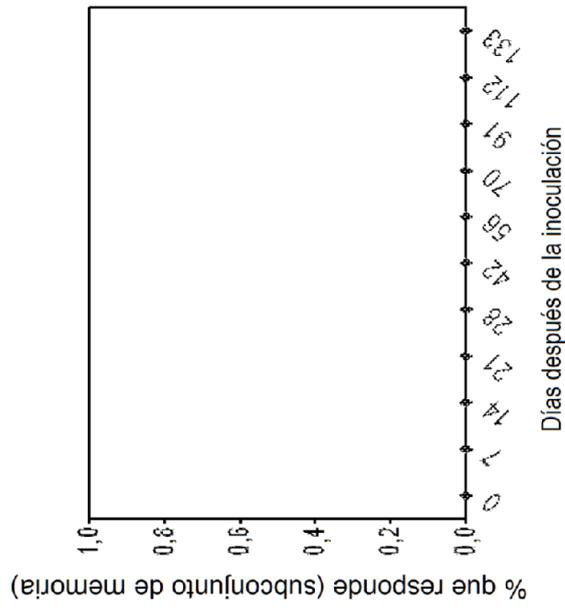


FIG. 7B



SIVrtn
SIVgag

FIG. 8A



SIVtat(SL8)
SIVgag(CM9)

FIG. 8B

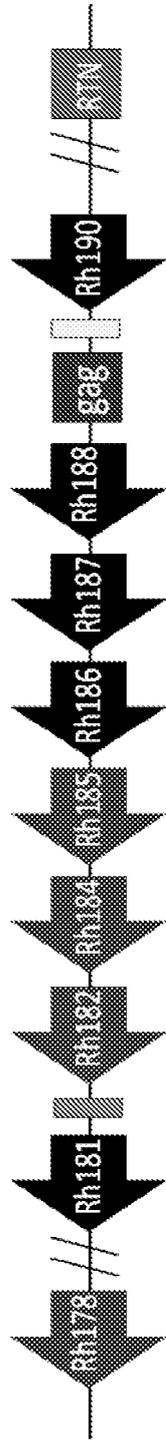


FIG. 9A

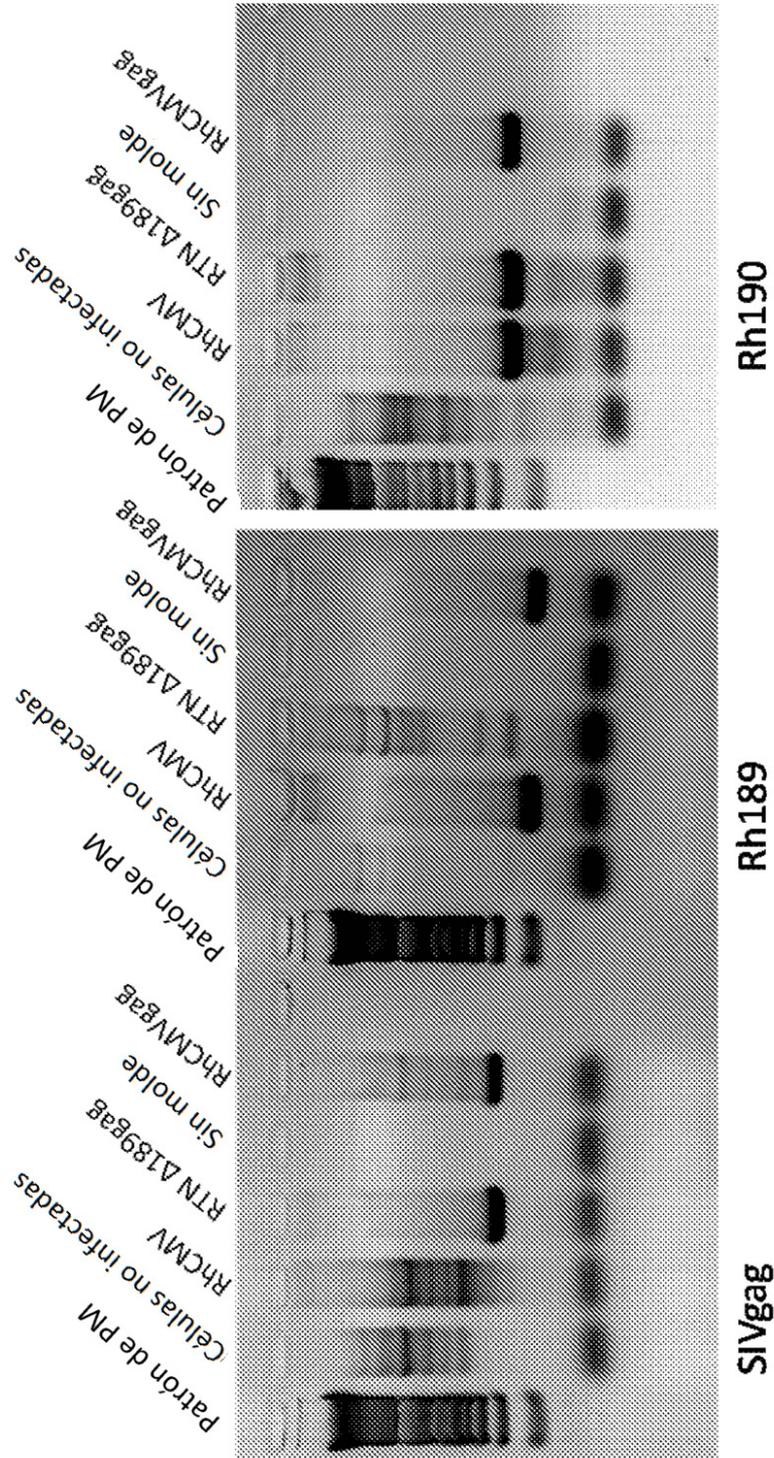


FIG. 9B

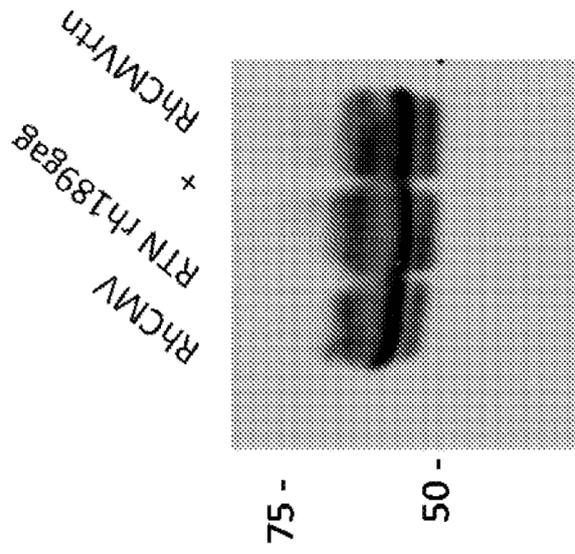


FIG. 9C

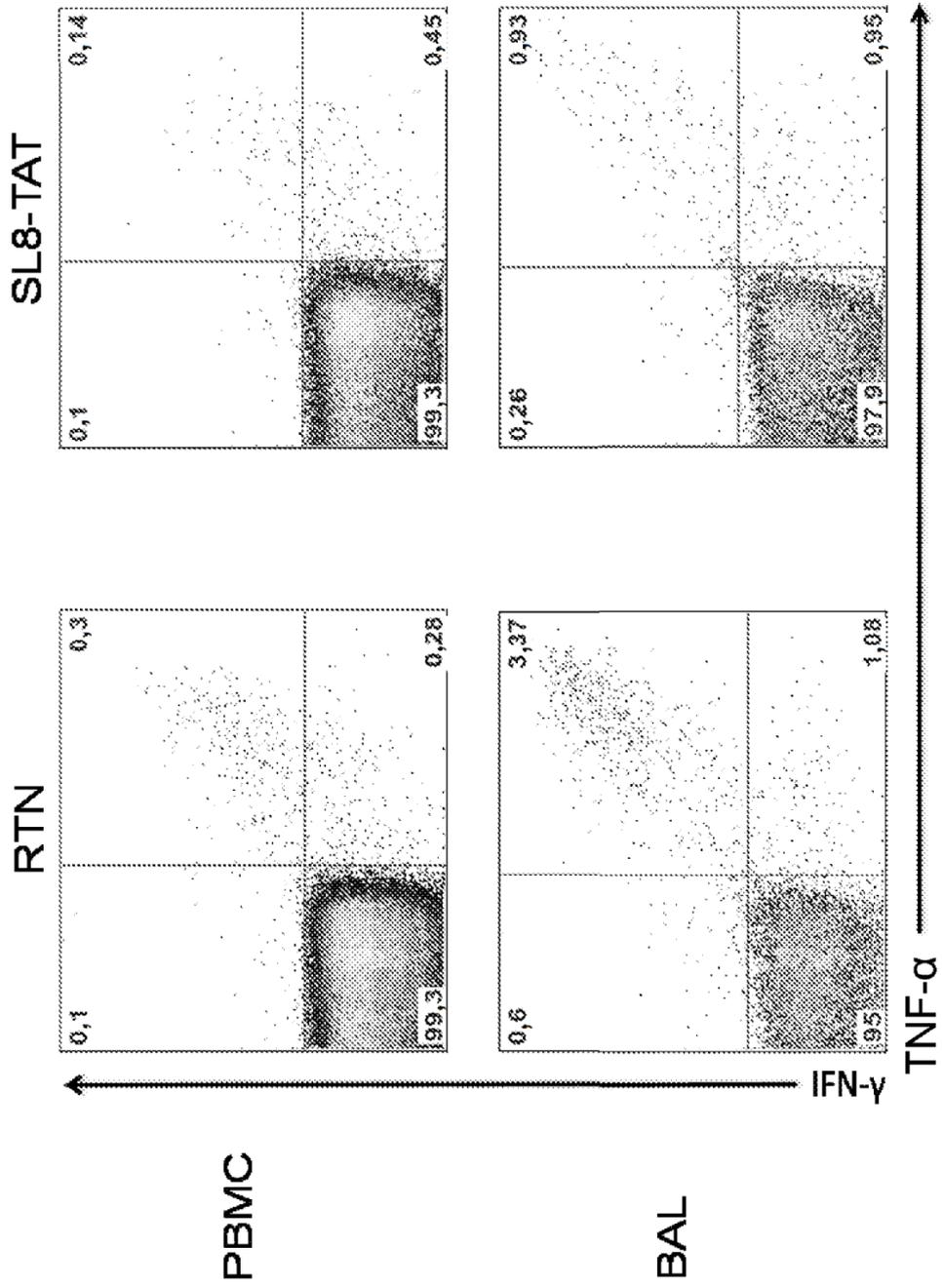


FIG. 10