

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 010**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/045 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2012** **PCT/US2012/030666**
87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012** **WO12135177**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2012** **E 12764664 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019** **EP 2691422**

54 Título: **Métodos y composiciones para la proteína IL-10 de citomegalovirus**

30 Prioridad:

29.03.2011 US 201161468945 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2019

73 Titular/es:

UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)
701 20th St. South, AB770
Birmingham, Alabama 35294-0107, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

WALTER, MARK R. y
BARRY, PETER A.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 716 010 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

Métodos y composiciones para la proteína IL-10 de citomegalovirus

5 Declaración de prioridad

Esta solicitud reivindica el beneficio, bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional de Estados Unidos núm. de serie 61/468,945, presentada el 29 de marzo de 2011.

10 Declaración de apoyo gubernamental

Los aspectos de esta invención se financiaron con las ayudas núm. R01 AI49342 y RO1 AI047300 del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la proteína IL-10 de citomegalovirus, a sus anticuerpos, y ácidos nucleicos que codifican la proteína IL-10 de citomegalovirus, así como también su uso en métodos terapéuticos.

20 Antecedentes

Citomegalovirus (CMV) establece infecciones virales subclínicas persistentes en la mayoría de la población. Sin embargo, las patologías serias inducidas por CMV (ceguera, pérdida de la audición, retraso mental) se presentan en fetos y recién nacidos, así como también en pacientes receptores de trasplante y con síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) (que incluye retinitis y neuropatías), con sistemas inmunitarios inmaduros o comprometidos. La capacidad de CMV para evadir la detección y eliminación inmunitaria se facilita por proteínas múltiples codificadas en su genoma que interrumpen el procesamiento del huésped y la presentación de antígenos virales, e interfieren con la señalización de quimiocinas y citocinas.

30 La vía de señalización de interleucina-10 (IL-10) se utiliza por CMV, y muchos otros virus (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), Hepatitis B y C) que establecen infecciones persistentes (Blackburn y Wherry, 2007; Rigopoulou y otros, 2005). La principal función de la IL-10 celular (cIL-10) es para proteger el huésped de respuestas inflamatorias exageradas mediante la inhibición de la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como también el complejo mayor de histocompatibilidad complejo (MHC) y B7 en una variedad de tipos celulares (de Waal Malefyt y otros, 1991a; de Waal Malefyt y otros, 1991b). El CMV Humano (HCMV) y el CMV de Rhesus (RhCMV) codifican homólogos de IL-10 funcionales (~26 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la de las proteínas cIL-10 codificadas por sus huéspedes humano y rhesus, respectivamente) que muestran las mismas actividades inmunosupresoras de IL-10 celular (Chang y otros, 2004; Kolenko y otros, 2000; Lockridge y otros, 2000). Los estudios funcionales con HCMVIL-10 (cmvIL-10) demuestran que previene el cebado efectivo de las células T mediante la inhibición de la maduración y el tráfico de las células dendríticas (DC), así como también inhibe la interleucina-12(IL-12), el MHC, y la producción de moléculas coestimuladoras (Chang y otros, 2004). Las funciones de cmvIL-10 parecen ser críticas para el ciclo de vida del virus debido a que se conserva altamente en secuencia entre numerosas cepas adaptadas al cultivo y aislados clínicos.

45 Para la actividad biológica, cIL-10 y cmvIL-10 deben unirse a las cadenas de los receptores IL-10R1 e IL-10R2 (Moore y otros, 2001). Los estudios de unión demuestran que HuIL-10 y cmvIL-10 forman interacciones equivalentes de alta afinidad (~1nM) con la cadena IL-10R1 y contactos de baja afinidad (~µM) con la cadena IL-10R2 (Yoon y otros, 2006). Como un resultado, la interacción IL-10/IL-10R1 ocurre primero, seguido por el ensamble del complejo ternario IL-10/IL-10R1/IL-10R2, que activa cinasas intracelulares (Jak1 y Tyk2) y factores de transcripción (STAT3) lo que conduce a las respuestas celulares de IL-10 (Moore y otros, 2001).

50 La presente invención proporciona el descubrimiento de que la proteína IL-10 de citomegalovirus puede modificarse para tener actividad funcional reducida mientras que retiene la inmunogenicidad. Por lo tanto, la presente invención supera los inconvenientes previos en la técnica al proporcionar una proteína IL-10 modificada de citomegalovirus y sus fragmentos biológicamente activos, así como también ácidos nucleicos que codifican esta proteína y sus fragmentos. Estas proteínas, fragmentos y ácidos nucleicos se usan, por ejemplo, en métodos para tratar y prevenir la infección por citomegalovirus.

60 Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus seleccionada de:
(i) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:3, o que consiste en la secuencia de aminoácidos

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPAATTTTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKP
TLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLE
SIYKDMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQR
EDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESIIYK
DMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR
VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
STLESIIYKDMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,

o

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQR
EDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESIIYK
DMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK

o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de K58, Q62, E160 y D162, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:3;

(ii) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de R63, Q67, E174 y D176, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:1, preferentemente por una sustitución de aminoácido en uno o más de Q67R, R63E, E174Q y D176H, más preferentemente por sustituciones de aminoácidos en Q67R y D176H o por sustituciones de aminoácidos en E174Q y D176H, en donde la sustitución de aminoácido(s) resulta(n) en un fenotipo de unión reducida a una proteína receptora de interleucina 10 (IL-10) y que retiene la inmunogenicidad en comparación con una proteína IL-10 de citomegalovirus que carece dicha(s) sustitución(ones).

Los aspectos adicionales de esta invención incluyen una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, así como también un vector que comprende la molécula de ácido nucleico.

Otros aspectos de esta invención incluyen una composición que comprende la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, una molécula de ácido nucleico de esta invención y/o un vector de esta invención, en un portador aceptable farmacéuticamente.

Un método para generar una respuesta inmunitaria a citomegalovirus en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, una molécula de ácido nucleico de esta invención, un vector de esta invención y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación que se describe en la presente descripción.

Además, la presente invención proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, una molécula de ácido nucleico de esta invención, un vector de esta invención y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación para su uso en tratar la infección por citomegalovirus en un sujeto.

Un método para prevenir o mejorar una infección primaria de citomegalovirus en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, una molécula de ácido nucleico de esta invención, un vector de esta invención y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación que se describe en la presente descripción.

La presente invención además proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, una molécula de ácido nucleico de esta invención, un vector de esta invención y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación para su uso en reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un receptor de trasplante y/o en un sujeto inmunocomprometido o inmunodeprimido.

La presente invención además proporciona un anticuerpo neutralizante específicamente reactivo contra una proteína IL-10 de citomegalovirus seleccionado de:

(i) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:3, o que consiste en la secuencia de aminoácidos

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPAATTTTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKP
 TLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLE
 SIYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,
 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQR
 EDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESIIK
 DMRQCPLLGCGDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,
 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR
 VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
 STLESIIKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,
 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQR
 EDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESIIK
 DMRQCPLLGCGDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK

o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de K58, Q62, E160 y D162, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:3; (ii) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de R63, Q67, E174 y D176, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:1, preferentemente por una sustitución de aminoácido en uno o más de Q67R, R63E, E174Q y D176H, más preferentemente por sustituciones de aminoácidos en Q67R y D176H o por sustituciones de aminoácidos en E174Q y D176H. Otros aspectos descritos incluyen un método para prevenir o mejorar una infección por citomegalovirus en un sujeto, reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un receptor de trasplante y/o reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un sujeto inmunocomprometido o inmunodeprimido que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo específicamente reactivo contra una proteína IL-10 de citomegalovirus. En algunas modalidades, el anticuerpo específicamente bloquea la actividad funcional de IL-10 de citomegalovirus. En modalidades particulares, el sujeto o receptor de trasplante es un humano y el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se tornarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Purificación y estructura cuaternaria de rhcmvIL-10.GF Cromatografías de HuIL-10 (gris) y rhcmvIL-10 (negro). (Inserto) gel de SDS-PAGE de rhCMVIL-10 purificado por afinidad (carril 1) y fracciones agrupadas del pico principal de la filtración en gel (carril 2).

Figuras 2A-B. Secuencia y modelo estructural de los residuos de unión de rhcmvIL-10. (A) Alineamiento de secuencias de proteínas IL-10 humana y de rhesus, celular y viral. Las hélices de cIL-10(HuIL-10) humana se indican en el alineamiento y se marcan con A-F. Los residuos elegidos para mutagénesis se identifican con flechas. (B) Modelo estructural de la interfaz rhcmvIL-10/Rhesus IL-10R1 (RhIL-10R1) basado en la estructura del cristal del complejo HuIL10/IL-10R1 (núm. de acceso de la base de datos de proteínas pdbid 1Y6K, Yoon y otros, 2006). Los residuos elegidos para mutagénesis que interrumpen la unión IL-10R1 se muestran en negro y K34, que presenta esencialmente actividad WT, se muestra en gris oscuro.

Figura 3. Expresión e unión a IL-10R1 de los mutantes puntuales de rhcmvIL-10. La expresión de los mutantes puntuales de rhcmvIL-10 en medios de células de *Drosophila* se caracterizó mediante inmunoelectrotransferencia (WB). Los sobrenadantes de las células que contienen los mutantes puntuales se incubaron con perlas acopladas a HuIL-10R1. Después de lava, las perlas se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12 % y subsecuentemente se tiñeron con tinte azul de Coomassie.

Figuras 4A-B. Capacidad de los mutantes de rhcmvIL-10 para proliferar en células TF-1/HuIL-10R1. (A) Sobrenadantes de las células que contienen mutantes puntuales sencillos de rhcmvIL-10 [Lys-34Glu (R34E), Gln-38Arg (Q38R), Asp-144His (D144H)] se evaluaron por su capacidad para proliferar en células TF-1/HuIL-10R1. (B) Ensayo de proliferación celular TF-1 de los sobrenadantes de células que contienen rhcmvIL-10WT y mutantes dobles de rhcmvIL-10 Gln-38Arg/Asp-144His (Q38D144) y Glu-142Gln/Asp-144(E142D144).

Figura 5. Ausencia de actividad funcional con mutantes de rhcmvIL-10 M1 y M2. La producción de IL-12 se evaluó en el sobrenadante de PBMC de rhesus de tres monos (Mmu 1, Mmu 2, Mmu 3) activadas con LPS solo, o LPS más concentraciones crecientes de rhcmvIL-10 WT, M1, o M2 en un intervalo de concentración de 0,1-1000 ng/mL. Los resultados de las PBMC de rhesus incubadas con medio solo se representan en la columna de la derecha. Sólo rhcmvIL-10 WT suprimió la producción de IL-12 estimulada por LPS.

Figura 6. Análisis de anticuerpos neutralizantes de rhcmvIL-10 (NAb) después de la vacunación. Seis monos infectados con RhCMV se inmunizaron tres veces con vectores de expresión plasmídicos para M1 y M2 (flechas negras continuas) y dos veces con proteína recombinante adyuvada en Montanide ISA 720. Los seis animales mostraron respuestas aumentadas de la unión de Ab (datos no mostrados) y cinco animales mostraron respuestas aumentadas de NAb después de las inmunizaciones con proteína, basado en el ensayo de IL-12 descrito en la Figura 5. La línea continua en ~16 % de IL-12 restaurada representa la mediana de la respuesta NAb en los monos infectados naturalmente (ver la Figura 12A). El eje X marca los tiempos de vacunaciones (Vxs) de ADN y proteína como se describe en la Tabla 4. Los puntos en el gráfico indican extracciones de sangre después de la Vx, que se probaron subsecuentemente para presencia de rhcmvIL-10 NAb mediante ELISA de IL-12. La inducción en por ciento de IL-12 indica el aumento en la producción de IL-12 entre PBMC activados con LPS incubados con plasma versus PBMC incubados con plasma y rhcmvIL-10.

Figura 7. Seroprevalencia del anticuerpo rhcmvIL-10 en macacos rhesus. Las muestras de plasma de macacos confirmados negativos (N = 35) o positivo (N = 53) para RhCMV se evaluaron para detectar la presencia de anticuerpos rhcmvIL-10 mediante un ELISA de rhcmvIL-10. Las muestras seropositivas para RhCMV tuvieron títulos significativamente mayores de anticuerpo rhcmvIL-10 que las muestras seronegativas ($p < 0,0001$) con un intervalo de 3 a 24 Unidades Relativas (UR). El valor de la mediana se representa mediante la línea.

Figuras 8A-B. (A) Cuantificación de los títulos de anticuerpo rhcmvIL-10 por luminosidad fluorescente (columnas blancas, unidades en el eje Y izquierdo) versus ELISA de rhcmvIL-10 (columnas negras, eje Y derecho) para 16 monos infectados con RhCMV (#1-16) y 4 no infectados con RhCMV (#17-20). (B) Detección por transferencia Western de la seroreactividad a rhcmvIL-10 en monos infectados con RhCMV (#1-4, 12, 13, 15, y 16) y monos no infectados (#17 y 18). Una muestra de plasma de un mono hiperinmune se incluyó como un control positivo (P, carril 9). Todas las muestras seropositivas para RhCMV fueron positivas para anticuerpos contra rhcmvIL-10 con la banda del tamaño previsto en ~20 kilodaltons (kDa) mientras que las muestras de plasma de monos no infectados con RhCMV fueron negativas. MW: Peso Molecular (en kDa).

Figuras 9A-B. (A) Una comparación por edad de las respuestas rhcmvIL-10 en 53 macacos seropositivos para RhCMV estratificados en 3 grupos de edad; infantes (≤ 1 año), adultos (5-10 años) y ancianos (> 13 años). Los infantes tuvieron significativamente mayores títulos de anticuerpo que los adultos y ancianos ($p < 0,001$, $p < 0,01$, respectivamente). No hubo diferencia significativa entre los grupos de animales adultos y ancianos. (B) El análisis de regresión lineal de los títulos de RhCMV y anticuerpo rhcmvIL-10 de 53 macacos rhesus. Hubo una correlación significativa entre los títulos de RhCMV total y de anticuerpo rhcmvIL-10 con los títulos de anticuerpo RhCMV ($r = 0,6176$, $p < 0,0001$).

Figura 10. Respuesta de unión de anticuerpo rhcmvIL-10 durante la infección primaria de RhCMV. Seis monos rhesus se inocularon experimentalmente con la cepa 68-1 de RhCMV y se analizaron prospectivamente durante 10 semanas. Los anticuerpos rhcmvIL-10 se detectaron 2 - 3 semanas después de la inoculación de RhCMV en 4 de los 6 animales mientras que los restantes dos desarrollaron una respuesta detectable en las semanas 6-7. El umbral de corte se estableció en 2 UR.

Figura 11. La avidéz de los anticuerpos rhcmvIL-10 de 50 macacos rhesus seropositivos se evaluó mediante un ELISA de avidéz con un lavado con urea 6M. La relación de avidéz promedio fue 0,83 (desviación estándar = 0,076). No hubo diferencia significativa entre los grupos de edad.

Figuras 12A-B. La neutralización de rhcmvIL-10 se determinó por la incubación de PBMC activados con LPS con una mezcla preincubada de rhcmvIL-10 y plasma de rhesus, o plasma solo. La neutralización se calculó como el inverso de la relación de (IL-12 expresada en presencia de rhcmvIL-10/plasma)/(IL-12 expresada en presencia de plasma solo) y se expresó como el "por ciento de restauración de la inducción de IL-12." (A) títulos de neutralización de rhcmvIL-10 variaron de 0-100 % de inducción de IL-12 restaurada con una diferencia significativa entre las muestras de RhCMV seropositivas y seronegativas ($p = 0,0083$). La neutralización mediana (% de inducción de IL-12 restaurada) fue 16 % (indicada mediante la línea). (B) El % de inducción de IL-12 restaurada se encontró que se correlaciona directamente con los títulos de anticuerpo rhcmvIL-10 en monos seropositivos a RhCMV ($r = 0,8292$, $p < 0,0001$).

Figuras 13A-C. Inmunización de monos vírgenes con rhcmvIL-10 y detección de ADN de RhCMV en la saliva de monos control o vacunados con rhcmvIL-10 (Vx'd) expuestos con inoculación subcutánea de RhCMV. (A) Cuatro monos vírgenes se inmunizaron contra rhcmvIL-10 M1 y M2 mediante el uso de una estrategia combinada de cebado de ADN (1X) y refuerzo de proteína (3X). La restauración de la expresión de IL-12 en PBMC activados con LPS midió la generación de NAb (ver Figura 5). (B) Frecuencia de ADN detectable de RhCMV en hisopos orales seguido de la fase de estado latente entre el tiempo de inoculación y la primera muestra positiva en cualquiera de los monos control y Vx'd. (C) Genomas acumulativos de RhCMV en saliva (AUC) en monos control y Vx'd. Los resultados se analizaron por Mann Whitney (una cola).

Figuras 14A-B. La velocidad a la cual los animales no infectados con RhCMV se seroconvierten frente a antígenos de RhCMV después del nacimiento en un corral de cría libre (A) o después de la reubicación de 15 animales no infectados y 1 infectado con RhCMV. Las velocidades observadas de seroconversión (línea continua y cuadrados) se grafican relativas

a las velocidades teóricas de seroconversión (línea discontinua y triángulos) en las cuales el número de animales seropositivos se duplica cada 35 (A) o 56 (B) días.

Figuras 15A-B. Diseminación de RhCMV en monos infectados con RhCMV. (A) Las frecuencias de ADN de RhCMV detectable en muestras de saliva y orina colectadas durante 12 semanas consecutivas. (B) La magnitud acumulada de la eliminación de RhCMV en saliva se calculó como el Área Bajo la Curva (AUC). Las líneas representan los valores de la mediana.

Figura 16. Diseminación de RhCMV en monos control y vacunados (Vx) expuestos a RhCMV. Monos infectados con RhCMV. La eliminación acumulada de RhCMV en saliva mostró disminuciones significativas en eliminación para un subconjunto de animales vacunados.

Figuras 17A-B. Ausencia de actividad funcional con mutantes de rhcmvIL-10 M1 y M2. (A) Células TF1 que expresan IL-10R humano se evaluaron para determinar la proliferación en presencia de cIL-10 humano, rhcmvIL-10 silvestre (WT), rhcmvIL-10 M1 y M2, o medio solo. (B) La producción de IL-12 se evaluó en el sobrenadante de PBMC de rhesus activados con LPS solo o LPS más concentraciones crecientes de rhcmvIL-10 WT, M1, o M2 (0,1 ng; 1 ng; 10 ng; 100 ng; o 1000 ng), o medio solo. Se muestran los resultados para los PMBC de 2 monos (Mmu 1 y 2).

Figura 18. Detección de NAb para rhcmvIL-10 en monos infectados con RhCMV. Las muestras de plasma se evaluaron por la capacidad de neutralizar los efectos inmunosupresores de rhcmvIL-10 en PBMC activados con LPS. Las muestras de plasma con los títulos más altos de NAb se observan para la producción más alta de IL-12 seguido de la incubación de PBMC con rhcmvIL-10 WT y plasma. Los resultados se expresan como el por ciento de restauración de la inducción de IL-12 en comparación con la incubación de PBMC con LPS y medio.

Figura 19. Seis monos infectados con RhCMV se inmunizaron tres veces con vectores de expresión plasmídicos para M1 y M2 (flechas negras continuas) y dos veces con proteína recombinante adyuvada en Montanide ISA 720. Los seis animales mostraron respuestas aumentadas de unión de Ab (no mostrado), y cinco animales mostraron respuestas aumentadas de NAb después de las inmunizaciones con proteína, en base al ensayo basado en IL-12 descrito en la Figura 5. La línea continua en ~16 % de IL-12 restaurada representa la respuesta mediana de NAb en monos infectados naturalmente (Figura 5).

Figura 20. Frecuencia de células CD8^{Pos} CD28^{Neg} CD45RA^{Pos} en juveniles (3-5 años) y adultos mayores (13-23 años).

Figura 21. Vacunación con ADN y proteína y esquema de exposición a RhCMV. Un grupo de 4 macacos juveniles no infectados con RhCMV se inmunizó en el transcurso de 26 semanas con una mezcla de dos formas diferentes no funcionales de rhcmvIL-10, M1 y M2, por un cebador de ADN heterólogo (50 ug ID y 100 ug IM) y 3 refuerzos de proteínas (50 ug ID y 100 ug IM). Todos los animales se expusieron con 1000 p.f.u. de RhCMV_{UCD59} a las 34 semanas. Las biopsias de piel se tomaron a la semana 1 después de la exposición (p.c.). Las muestras de sangre, hisopo oral y orina se tomaron semanalmente hasta la semana 8 semana, y después cada dos semanas hasta la semana 26.

Figuras 22A-B. Vacunación con rhcmvIL-10M1/M2 estimula títulos altos de unión y anticuerpo neutralizante. (A) Los anticuerpos de unión rhcmvIL-10 se encontraron en el plasma de los 4 vacunados según se midió por ELISA de rhcmvIL-10. (B) Títulos altos de anticuerpo rhcmvIL-10 neutralizante (NAb) se observaron en 3 de los 4 animales vacunados. Niveles moderados de NAb se observaron en el cuarto animal con títulos picos alcanzados 2-3 semanas después del tercer refuerzo de proteína.

Figura 23. Replicación alterada de RhCMV e inflamación del huésped en el sitio de inoculación. Imágenes representativas de biopsias obtenidas del sitio de inoculación 7 días después de la inoculación. Cortes seriados del tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los vacunados mostraron una disminución en el infiltrado inflamatorio con una disminución específica en el infiltrado celular polimorfonuclear (PMN). Los animales vacunados tuvieron menos células infectadas, observado por la presencia de células citomegálicas, como se observa en la tinción H & E.

Figuras 24A-B. Generación de anticuerpos de unión a rhcmvIL-10 y RhCMV en animales vacunados con rhcmvIL-10 (o) y controles no vacunados (Δ). Los títulos de anticuerpo se analizaron mediante ELISA específica de antígeno. Las unidades de absorbancia (A_{450}) se midieron a 450 nm. Las muestras de plasma (A) se diluyeron a 1:100 y muestras de hisopo oral (B) se diluyeron 1:10. La semana 0 indica el tiempo de la exposición a RhCMV. Las líneas indican el promedio de los grupos vacunados y no vacunados, respectivamente. Las líneas horizontales discontinuas indican el umbral para una respuesta positiva de anticuerpo. Promedio a la semana 0 = 0,052.

Figura 25. Generación de anticuerpos neutralizantes de rhcmvIL-10 después de la exposición. Los 4 animales vacunados (o) y los 4 animales controles (Δ) se probaron para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes en plasma. Las muestras de plasma se diluyeron 1:1000 y se probaron semanalmente hasta la semana 8 y después cada dos semanas hasta la semana 26. Las líneas indican el promedio de los grupos vacunados y no vacunados respectivamente.

Figuras 26A-C. Frecuencia de ADN viral de RhCMV y frecuencia y carga viral acumulada en los fluidos corporales. El plasma, hisopos orales y orina se colectaron semanalmente y cada dos semanas y se probaron para detectar ADN de

RhCMV (gB) mediante qPCR. (A) Se encontró que el plasma del grupo de la vacuna tiene una frecuencia significativamente menor de muestras con ADN de RhCMV en la sangre que los controles ($p=0,0286$ Mann-Whitney de una cola). (B) La frecuencia de la eliminación viral en los fluidos corporales (hisopo oral y orina combinados) se encontró ser significativamente menos en el grupo de la vacuna que los controles ($p=0,014$ Mann-Whitney de una cola). Los datos representan un resumen de las Figuras 27 y 28. Las cargas virales totales (C) en los fluidos corporales, derivadas de la combinación de los niveles de ADN de gB de todos los puntos de tiempo, también fueron menores en los animales vacunados ($p=0,014$ Mann-Whitney de una cola).

Figura 27. Diseminación de RhCMV en la saliva de los animales vacunados y controles. Las cargas genómicas de RhCMV (gB qPCR) en hisopos orales se midieron mediante qPCR y se muestran como copias/mL. El límite de detección fue 1000 copias/ml, pero para la consistencia con los resultados del qPCR de la orina, el eje Y comienza en 100.

Figura 28. Diseminación de RhCMV en la orina de los animales vacunados y controles. Las cargas genómicas de RhCMV (gB qPCR) en la orina se midieron mediante qPCR y se muestran como copias/mL. El límite de detección fue 100 copias/ml.

Figuras 29A-B. Análisis de FACS de la respuesta específica de células T IFN- γ /CD4+ a rhcmvIL-10 y RhCMV. (A) Todos los animales en el grupo de la vacuna muestran niveles positivos de respuesta específica de células T CD3+/CD4+ IFN- γ a la semana 0 (negro) o semana 4 (blanco). El porcentaje de células representa aquellas activadas del total de células vivas CD3+/CD4+. La línea negra representa el valor de corte positivo a 0,005 %. (B) Los animales vacunados muestran una tendencia de respuesta aumentada de células T CD4+, específica a RhCMV en comparación con controles a la semana 4 p.c.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la proteína IL-10 de citomegalovirus puede modificarse para tener unión reducida a un receptor de interleucina-10 (IL-10) y actividad funcional reducida mientras que retiene su inmunogenicidad. Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus seleccionada de:

(i) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:3, o que consiste en la secuencia de aminoácidos

```

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPAATTTTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKP
TLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLE
SIYKDMRQCPLLGCSDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,

```

```

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQR
EDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESIIYK
DMRQCPLLGCSDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,

```

```

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR
VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
STLESIIYKDMRQCPLLGCSDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK,

```

```

o
MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQR
EDDYSVWLDGTVVKGCWGCVMWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESIIYK
DMRQCPLLGCSDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK

```

o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de K58, Q62, E160 y D162, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:3;

(ii) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de R63, Q67, E174 y D176, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:1, preferentemente por una sustitución de aminoácido en uno o más de Q67R, R63E, E174Q y D176H, más preferentemente por sustituciones de aminoácidos en Q67R y D176H o por sustituciones de aminoácidos en E174Q y D176H, en donde la sustitución de aminoácido(s) resulta(n) en un fenotipo de unión reducida a una proteína receptora de interleucina 10 (IL-10) y que retiene la inmunogenicidad en comparación con una proteína IL-10 de citomegalovirus que carece dicha(s) sustitución(ones).

En modalidades particulares, la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención puede comprender una mutación en uno o más aminoácidos ubicados a partir de la posición 39 a la posición 78 y/o de la posición 155 a la posición 176 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, que es la secuencia de aminoácidos de IL-10 de CMV humano. En algunas modalidades, la proteína IL-10 de citomegalovirus puede comprender una mutación en K58, Q62, E160 y/o D162 de la SEQ ID NO:3, en cualquier combinación.

En otras modalidades, la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención puede comprender una mutación en uno o más aminoácidos ubicados a partir de la posición 42 a la posición 85 y/o posición 169 a la posición 189 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o 2, que es la secuencia de aminoácidos de IL-10 de CMV de rhesus. En algunas modalidades, la proteína IL-10 de citomegalovirus puede comprender una mutación en R63, Q67, E174 y/o D176 de la SEQ ID NO:1 o 2, en cualquier combinación. En modalidades particulares, la proteína IL-10 de citomegalovirus puede comprender una mutación Q67R, una mutación R63E, una mutación E174Q y/o una mutación D176H, en cualquier combinación.

Las modalidades adicionales de esta invención incluyen proteína IL-10 de CMV de rhesus que comprende una mutación Q67R y una mutación D176H, referidas en la sección de Ejemplos en la presente descripción como M1. En una modalidad adicional, se proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus, que comprende una mutación E174Q y una mutación D176H, referidas en la sección Ejemplos en la presente descripción como M2.

Las mutaciones particulares descritas en la presente descripción (por ejemplo, Q67R, R63E, E174Q, D176H) son ejemplos de mutaciones de esta invención y se entiende que la presente invención abarca la sustitución de cualquier residuo de aminoácido presente de manera natural y/o no natural por cualquier de los residuos de aminoácido descritos en la presente descripción. Estaría dentro de la habilidad del experto en la técnica producir cualquiera de tales mutantes y probarlos para determinar las características fenotípicas de la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención.

La presente invención incluye mutaciones en cualquier proteína IL-10 de citomegalovirus en los residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos de aminoácidos descritos en la presente descripción. Un experto en la técnica será capaz de determinar cuáles residuos de aminoácidos en una secuencia dada de IL-10 de CMV corresponden a aquellos identificados en la presente descripción de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tal como el alineamiento. Por ejemplo, se proporciona un alineamiento de varias secuencias de aminoácidos de cmvIL-10 humano en la sección ALINEAMIENTO DE SECUENCIA proporcionada en la presente descripción, que muestra los residuos de aminoácidos que corresponden a aquellos descritos en la presente descripción. Estas secuencias de aminoácidos tienen longitudes diferentes debido a al número variante de treoninas cerca del terminal N de esta proteína. En consecuencia, el residuo de aminoácido correspondiente tiene un número diferente y estos números correspondientes se proporcionan en el ALINEAMIENTO DE SECUENCIA proporcionado a continuación.

Como se usa en la presente descripción, "proteína IL-10 de citomegalovirus" significa la proteína, y cualquier subporción o fragmento (por ejemplo, 15-20 aminoácidos) de la proteína de longitud completa, codificada por la secuencia de ácido nucleico del marco abierto de lectura UL111A del genoma de citomegalovirus humano (por ejemplo, Número de Acceso a la Base de Datos GenBank® AF202536. En algunas modalidades, la proteína IL-10 de citomegalovirus puede significar la proteína, y cualquier subporción de la proteína de longitud completa, codificada por la secuencia de ADN de los marcos abierto de lectura UL111A y UL111 del genoma de citomegalovirus de rhesus (por ejemplo, Números de Acceso a la Base de Datos GenBank® AF200417 y AF200740.

Como se usa en la presente descripción, "un fenotipo de unión reducida a una proteína receptora de IL-10 y actividad funcional reducida" significa interacción(ones) deterioradas o reducidas entre la proteína IL-10 de citomegalovirus y el receptor celular de IL-10, y capacidad deteriorada o reducida para estimular las respuestas celulares que resultan de la activación de las vías de señalización del complejo IL-10R1/IL-10R2 con relación a un control, según se determina de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

La reducción en la unión y actividad funcional es con relación a la unión y actividad funcional de una proteína IL-10 de citomegalovirus que carece una mutación de esta invención (por ejemplo, un control, que puede ser, por ejemplo, una proteína IL-10 de citomegalovirus silvestre). La reducción en la actividad de unión puede ser aproximadamente del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % con relación a una proteína IL-10 de citomegalovirus control. Además, la reducción en la actividad funcional puede ser aproximadamente del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % con relación a una proteína IL-10 de citomegalovirus control. Estas reducciones en la unión y/o actividad funcional pueden ser también, por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, o más con relación a un control. Los ensayos para determinar la actividad de unión y los ensayos para determinar la actividad funcional de una proteína IL-10 de citomegalovirus son bien conocidos en la técnica y se describen en la sección de Ejemplos proporcionada en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, un fenotipo de inmunogenicidad retenida describe una proteína IL-10 de CMV de esta invención que tiene inmunogenicidad (es decir, la capacidad para generar una respuesta inmunitaria) equivalente a o mayor que la inmunogenicidad de una proteína IL-10 de CMV que carece la(s) mutación(ones) descritas en la presente descripción. Tal inmunogenicidad retenida de una proteína IL-10 de CMV de esta invención puede determinarse de

acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, de manera que la inmunogenicidad de una proteína IL-10 de CMV de esta invención se compara con aquella de un control (por ejemplo, una proteína IL-10 de CMV silvestre).

5 La presente invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína cmvIL-10 o su fragmento de esta invención. También se proporciona en la presente descripción un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína cmvIL-10 y/o su fragmento de esta invención. El vector puede ser un vector de expresión que contiene todos los componentes genéticos requeridos para la expresión del ácido nucleico en las células en las que se ha introducido el vector, como se conocen bien en la técnica. El vector de expresión puede ser un vector de expresión comercial o puede ser construido en el laboratorio de
10 acuerdo con los protocolos estándares de biología molecular. El vector de expresión puede comprender ácido nucleico viral que incluye, pero no se limita a, ácido nucleico de poxvirus, virus vacuna, adenovirus, retrovirus, alfavirus y/o virus adenoasociados. El ácido nucleico o vector de esta invención puede también estar en un liposoma o un portador de entrega, que puede captarse por una célula mediado por receptor u otro tipo de endocitosis.

15 La molécula de ácido nucleico de esta invención puede estar en una célula, que puede ser una célula que expresa el ácido nucleico de manera que la proteína acmvIL-10 y/o su fragmento de esta invención se produce en la célula (por ejemplo, una célula huésped). Además, el vector de esta invención puede estar en una célula, que puede ser una célula que expresa el ácido nucleico del vector de manera que se produce una proteína cmvIL-10 y/o su fragmento de esta invención en la célula. También se contempla que los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención puedan estar presentes en un organismo huésped (por ejemplo, un organismo transgénico), que expresa los ácidos nucleicos de esta invención y produce la proteína cmvIL-10 y/o fragmentos de esta invención.

25 En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención pueden ser parte de un constructo de ácido nucleico recombinante que comprende cualquier combinación de sitios de restricción y/o elementos funcionales como se conocen bien en la técnica que facilitan la clonación molecular y otras manipulaciones del ácido nucleico recombinante. Por lo tanto, la presente invención además proporciona un constructo de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido y/o fragmento de esta invención.

30 La molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido y/o fragmento de cmvIL-10 de esta invención puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que codifique funcionalmente los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención. Para codificar funcionalmente los polipéptidos y/o fragmentos (es decir, permitir que los ácidos nucleicos se expresen), el ácido nucleico de esta invención puede incluir, por ejemplo, secuencias de control de la expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, un potenciador y sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción.

35 Los ejemplos no limitantes de secuencias de control de la expresión que pueden estar presentes en una molécula de ácido nucleico de esta invención incluyen promotores derivados de genes de metalotionina, genes de actina, genes de inmunoglobulina, CMV, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, etc. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido y/o fragmento seleccionado puede determinarse fácilmente en base al código genético para la secuencia de aminoácidos del polipéptido y/o fragmento seleccionado y muchos ácidos nucleicos codificarán cualquier polipéptido y/o fragmento seleccionado. También se contemplan las modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido y/o fragmento. Las modificaciones que pueden ser útiles son modificaciones a las secuencias que controlan la expresión del polipéptido y/o fragmento para hacer la producción del polipéptido y/o fragmento inducible o reprimible controlada por el inductor o represor apropiado. Tales métodos son estándar en la técnica. La molécula de ácido nucleico y/o vector de esta invención puede generarse por medios estándar en la técnica, tales como por técnicas de ácido nucleico recombinante y/o por síntesis ácido nucleico sintético o síntesis enzimática *in vitro*.

40 Los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención pueden transferirse a una célula huésped (por ejemplo, una célula procariótica o eucariótica) mediante métodos bien conocidos, que varían en dependencia del tipo de célula huésped. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se usa comúnmente para las células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, la transducción, el tratamiento con lípidos catiónicos y/o la electroporación pueden usarse para otras células huésped.

45 Los términos "mutación," "mutante" y otras variantes gramaticales abarcan, al nivel de secuencia de aminoácidos de una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, cualquier sustitución con cualquier residuo de aminoácido presente de manera natural (Tabla 1), cualquier sustitución con cualquier residuo de aminoácido no presente de manera natural (por ejemplo, como se enumera en la Tabla 2), cualquier eliminación, cualquier inserción, y cualquier combinación de estas en una secuencia de aminoácidos silvestre de una proteína IL-10 de citomegalovirus. Estos términos también pretenden abarcar la incorporación de sitios de glicosilación adicionales en la proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención, así como también modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína IL-10 de citomegalovirus que resultan en una alteración del marco de la proteína.

50 Estas mutaciones pueden introducirse al nivel de ácido nucleico al alterar o modificar la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-10 de citomegalovirus (por ejemplo, introducir en la secuencia de nucleótidos una eliminación, sustitución, inserción, codón de parada, mutación sin sentido invertida, mutación sin sentido, etc.) de acuerdo con métodos

bien conocidos para producir la mutación deseada al nivel de secuencia de aminoácidos. El resultado de estas mutaciones es el fenotipo de unión reducida a una proteína receptora de IL-10 y actividad funcional reducida como se define en la presente descripción. La producción y prueba de tales mutantes para identificar aquellos con el fenotipo de esta invención puede realizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en la presente descripción.

La presente invención además proporciona composiciones. Por lo tanto, en una modalidad, se proporciona en la presente descripción una composición que comprende una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención y un portador aceptable farmacéuticamente. También se proporciona en la presente descripción una composición que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención y un portador aceptable farmacéuticamente. Adicionalmente se proporciona en la presente descripción una composición que comprende un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención y un portador aceptable farmacéuticamente.

Un componente "aceptable farmacéuticamente" tal como una sal, portador, excipiente o diluyente de una composición de acuerdo con la presente invención es un componente que (i) es compatible con los otros ingredientes de la composición en que puede combinarse con las composiciones de la presente invención sin hacer la composición inadecuada para su propósito previsto, y (ii) es adecuado para su uso con sujetos como se proporciona en la presente descripción sin efectos secundarios adversos excesivos (tales como toxicidad, irritación, y respuesta alérgica). Los efectos secundarios son "excesivos" cuando su riesgo es mayor que el beneficio proporcionado por la composición. Los ejemplos no limitantes de los componentes aceptables farmacéuticamente (por ejemplo, portadores aceptables farmacéuticamente) incluyen, sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, microemulsiones y varios tipos de agentes humectantes. En particular, se pretende que un portador aceptable farmacéuticamente sea un portador estéril que se formule para administrar a o suministrar a un sujeto de esta invención.

Las composiciones de esta invención pueden comprender también un portador aceptable farmacéuticamente y un adyuvante adecuado. Como se usa en la presente, "adyuvante adecuado" describe un adyuvante capaz de ser combinado con el péptido y/o fragmento y/o molécula de ácido nucleico y/o vector de esta invención para generar o mejorar además una respuesta inmunitaria sin efecto perjudicial en el sujeto o la célula del sujeto. Un adyuvante adecuado puede ser, pero no se limita a, MONTANIDE ISA51 o ISA 720 (Seppic, Inc., Fairfield, NJ), formulación adyuvante SYNTEX 1 (SAF-1), compuesta de 5 por ciento (p/v) de escualeno (DASF, Parsippany, N.J.), 2,5 por ciento de Pluronic, polímero L121 (Aldrich Chemical, Milwaukee), y 0,2 por ciento de polisorbato (Tween 80, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen QS-21, adyuvante de Freund (completo e incompleto), sales de aluminio (alum), fosfato aluminico, hidróxido aluminico, N-acetilo-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-nor-muramilo-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como no-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(r-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacteria, monofosforil lípido A, trealosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en 2 % de emulsión de escualeno/Tween 80.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir también otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, diluyentes, citocinas inmunoestimuladoras, etc. Los métodos actuales para preparar tales formas de dosificación se conocen, o resultarán evidentes, para aquellos expertos en esta técnica.

Una "molécula inmunomoduladora" de esta invención puede ser, pero no se limita a una citocina inmunoestimuladora que puede ser, pero no se limita a, GM-CSF, interleucina-2, interleucina-12, interferón-gamma, interleucina-4, factor alfa de necrosis tumoral, interleucina-1, factor hematopoyético flt3L, CD40L, moléculas coestimuladoras B7.1 y moléculas coestimuladoras B7.2.

Ejemplos adicionales de una molécula inmunomoduladora de esta invención incluye los adyuvantes de esta invención, que incluyen, por ejemplo, formulación adyuvante SYNTEX 1 (SAF-1) compuesta de 5 por ciento (p/v) de escualeno (DASF, Parsippany, N.J.), 2,5 por ciento de Pluronic, polímero L121 (Aldrich Chemical, Milwaukee), y 0,2 por ciento de polisorbato (Tween 80, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato. Los adyuvantes adecuados incluyen también una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alum), fosfato de aluminio, o alganmulina, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivados de manera catiónica o aniónica, o polifosfazenos.

Otros adyuvantes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen QS-21, adyuvante de Freund (completo e incompleto), hidróxido de aluminio, N-acetilo-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-nor-muramilo-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como no-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacteria, monofosforil lípido A, trealosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en 2 % de emulsión de escualeno/Tween 80.

Los adyuvantes adicionales pueden incluir, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente 3-de-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Un sistema de adyuvante mejorado involucra la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL.

- como se describe en la publicación PCT número WO 94/00153 (los contenidos del cual se incorporan en la presente descripción mediante referencia), o una composición menos reactogénica donde el QS21 se desactiva con colesterol como se describe en la publicación PCT número WO 96/33739 (los contenidos de la cual se incorporan en la presente descripción mediante referencia). Una formulación de adyuvante particularmente potente que involucra QS21 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en la publicación PCT número WO 95/17210 (los contenidos de la cual se incorporan en la presente descripción mediante referencia). Además, el ácido nucleico de esta invención puede incluir un adyuvante al comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína A35R o su fragmento activo de esta invención y una secuencia de nucleótidos que proporciona una función adyuvante, tales como secuencias CpG. Tales secuencias CpG, o motivos, se conocen bien en la técnica.
- Además, se proporcionan en la presente descripción varios métodos que emplean la proteína IL-10 de citomegalovirus o sus fragmentos, moléculas de ácido nucleico, vectores y composiciones de esta invención. Un método para generar una respuesta inmunitaria a citomegalovirus en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína IL-10 de citomegalovirus o su fragmento, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación que se describe en la presente descripción.
- Los ejemplos no limitantes de una respuesta inmunitaria que puede ser generada o mejorada por los métodos de esta invención incluyen una respuesta de anticuerpos (por ejemplo, respuesta protectora de anticuerpos; respuesta de anticuerpos neutralizantes; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), una respuesta celular (por ejemplo, respuesta de células T citotóxicas; respuesta de células T colaboradoras; producción de interleucina-2 (IL-2); respuesta de células T reguladoras (Treg); respuesta de células T colaboradoras 1 (Th1); respuesta de células T colaboradoras 2 (Th2); respuesta de células T colaboradoras 17 (Th17)), una respuesta innata (por ejemplo, células dendríticas, células asesinas naturales, macrófagos, células polimorfonucleares (neutrófilos)), y cualquier combinación de estas.
- Adicionalmente, la presente invención proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus de la invención, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación para su uso en tratar una infección por citomegalovirus (por ejemplo, una infección primaria de citomegalovirus, una infección no primaria o secundaria de citomegalovirus, una infección reactivada de citomegalovirus) en un sujeto en necesidad de esta.
- Como se usa en la presente descripción, el término "infección primaria de citomegalovirus" significa la infección primera u original de citomegalovirus en un individuo sin previa inmunidad a citomegalovirus que puede o no acompañarse por signos y/o síntomas de infección clínicamente evidentes.
- Como se usa en la presente descripción, el término "infección no primaria o secundaria de citomegalovirus" significa una infección subsecuente de citomegalovirus en un individuo con previa inmunidad a citomegalovirus que puede o no acompañarse por signos y/o síntomas de infección clínicamente evidentes.
- Como se usa en la presente descripción, el término "infección reactivada de citomegalovirus" significa reactivación transcripcional de genomas virales latentes y la producción de viriones infecciosos de HCMV dentro de un huésped previamente infectado con HCMV, usualmente durante períodos de compromiso a la integridad funcional del sistema inmunitario (por ejemplo, inmunosupresión iatrogénica para trasplantes de órganos sólidos, médula ósea, o células madres hematopoyéticas; la aparición de SIDA en individuos infectados con VIH; pacientes enfermos críticamente; quimioterapias relacionadas con el cáncer, etc.), o inmadurez funcional del sistema inmunitario (por ejemplo, fetos/neonatos infectados congénitamente).
- Los términos "tratar," "que trata" o "tratamiento" incluyen cualquier tipo de acción que imparta un efecto modulador, que, por ejemplo, puede ser un efecto beneficioso, a un sujeto afectado con un trastorno, enfermedad, afección o condición, que incluye la mejora en el trastorno, enfermedad, afección o condición del sujeto (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la progresión del trastorno, enfermedad, afección o condición, retraso de la aparición del trastorno, enfermedad, afección o condición, y/o cambio en los parámetros clínicos, estado del trastorno, enfermedad, afección o condición, etc., como sería bien conocido en la técnica. Estos términos pueden significar también que la gravedad de la afección del sujeto se reduce, al menos parcialmente se mejora o estabiliza y/o que se alcanza algún alivio, mitigación, disminución o estabilización en al menos un síntoma/signo clínico.
- Los signos clínicos de infección por citomegalovirus en individuos inmunocompetentes pueden incluir, pero no se limitan a mononucleosis febril transiente (en ausencia de infección por el virus Epstein-Barr) y hepatitis leve (en ausencia de virus de hepatitis A, B y C). En individuos infectados con VIH que progresan a SIDA, las enfermedades asociadas con HCMV pueden incluir pero no se limitan a retinitis, enterocolitis, gastritis, esofagitis, hepatitis, y/o encefalitis. En los receptores de trasplantes (por ejemplo, órganos sólidos, médula ósea, células madres hematopoyéticas), enfermedades asociadas con HCMV pueden incluir fiebre, leucopenia, malestar, artralgia, y/o erupción macular o enfermedad invasiva de tejido, que se presentan como hepatitis, neumonitis, enterocolitis, encefalitis, coriorretinitis, nefritis, cistitis, miocarditis, y/o pancreatitis. En niños congénitamente infectados, las secuelas de HCMV pueden incluir petequias, ictericia, hepatoesplenomegalia, retraso en el crecimiento intrauterino (restricción), microcefalia, deficiencias neurológicas y cognitivas de sutiles a graves, pérdida de la audición neurosensorial, y/o coriorretinitis. Los parámetros clínicos de la infección por CMV que pudieran evaluarse para determinar la eficacia del tratamiento incluyen la detección de anticuerpos antivirales del huésped (IgM y IgG) en sangre, prueba de antígeno de fosfoproteína 65 (pp65), análisis cualitativo y/o cuantitativo de la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) de HCMV en sangre entera o sus constituyentes (plasma, suero, células mononucleares de sangre periférica, granulocitos) y muestras clínicas (por ejemplo, saliva, orina), cultivo de HCMV a partir de muestras clínicas en células susceptibles, y/o citopatología. El tratamiento apropiado puede conducir a una reducción en la gravedad de y/o la eliminación de uno o más de estos signos.

- 5 La "cantidad efectiva" o "cantidad efectiva para el tratamiento" como se usa en la presente descripción se refiere a una cantidad de una proteína, fragmento, molécula de ácido nucleico, vector y/o composición de esta invención que es suficiente para producir un efecto deseado, que puede ser un efecto terapéutico y/o una mejora. Alternativamente se declara que, una cantidad "efectiva para el tratamiento" o "efectiva" es una cantidad que proporcionará algún alivio, mitigación, disminución o estabilización en al menos un síntoma/signo clínico en el sujeto. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando algún beneficio se proporcione al sujeto. La cantidad efectiva o cantidad efectiva para el tratamiento variará con la edad, condición general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el compuesto, agente, sustancia o composición particular administrada, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el portador aceptable farmacéuticamente usado si hay, y factores similares dentro del conocimiento y experiencia de aquellos expertos en la técnica. Según sea apropiado, una "cantidad efectiva" o "cantidad efectiva para el tratamiento" en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la técnica por referencia a los textos y la literatura pertinentes y/o mediante el uso de experimentación de rutina. (Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20da Ed. 2000).
- 10 20 En modalidades adicionales, la presente invención proporciona una proteína IL-10 de citomegalovirus, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación, para su uso en prevenir o mejorar una infección primaria de citomegalovirus en un sujeto.
- 25 También se proporciona en la presente descripción una proteína IL-10 de citomegalovirus, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de la invención, en cualquier combinación, para su uso en prevenir o mejorar una infección primaria de citomegalovirus. Los términos "prevenir," "que previene," "que mejora," "prevención" (y variaciones gramaticales de esta) se refieren una prevención y/o retraso de la aparición de una enfermedad, trastorno y/o signos y/o síntoma(s) clínicos en un sujeto y/o una reducción o mejora en la gravedad de la aparición de la enfermedad, trastorno y/o síntoma(s) clínico(s) con relación a lo que pudiera ocurrir en ausencia de tal tratamiento. La prevención puede completarse, por ejemplo, la total ausencia de la enfermedad, trastorno y/o signos y/o síntoma(s) clínicos. La prevención puede ser también parcial, de manera que la ocurrencia de la enfermedad, trastorno y/o signos y/o síntoma(s) clínicos en el sujeto y/o la gravedad de la aparición es menor que lo que ocurriría en ausencia de la presente invención (es decir, mejorada).
- 30 35 Una cantidad para la "prevención efectiva" como se usa en la presente descripción es una cantidad que es suficiente para prevenir y/o retrasar la aparición de una enfermedad, trastorno y/o signos y/o síntomas clínicos en un sujeto y/o reducir y/o retrasar la gravedad de la aparición de una enfermedad, trastorno y/o signos y/o síntomas clínicos en un sujeto con relación a lo que ocurriría en ausencia de los métodos de la invención. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que el nivel de prevención no necesita ser completo, siempre y cuando se proporcione algún beneficio al sujeto.
- 40 45 La presente invención proporciona también una proteína IL-10 de citomegalovirus, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o la composición de la invención, en cualquier combinación, para su uso en reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un receptor de trasplante o para reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un sujeto inmunocomprometido o inmunodeprimido. Tal administración al receptor de trasplante en cualquier momento con relación al trasplante (es decir, antes, después y/o simultáneamente, en cualquier combinación) y con cualquier frecuencia necesaria para suministrar una cantidad efectiva como se describe en la presente descripción.
- 50 En la proteína IL-10 de citomegalovirus, ácido nucleico, un vector y/o composición para su uso como se describió anteriormente, tal reducción en el riesgo se identifica al comparar con el nivel de riesgo de infección por citomegalovirus en un sujeto de esta invención al que no se la ha administrado la proteína IL-10 de CMV, su fragmento, molécula de ácido nucleico, vector y/o composición de esta invención. La reducción en el riesgo puede ser aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % con relación a tal control, como se determinaría por protocolos bien conocidos en la técnica.
- 55 60 Un sujeto con riesgo de enfermedad por citomegalovirus incluye, pero no se limita a un feto que adquiere HCMV de su madre después de la transmisión transplacentaria, un receptor inmunodeprimido de trasplante, un sujeto inmunocomprometido, un sujeto que recibe quimioterapia, un sujeto enfermo críticamente, y/o un sujeto gravemente quemado. Estos sujetos con riesgo comparten en común una capacidad inmadura, deteriorada, o debilitada de desarrollar y/o mantener respuestas inmunitarias celulares y humorales a los antígenos de HCMV que pueden proteger contra los resultados clínicos asociados con la infección de HCMV. Los mecanismos por los cuales la presente invención pueden prevenir la infección congénita incluyen, pero no se limitan a, estimular la generación de anticuerpos que neutralizan la función de cmvIL-10 en mujeres no inmunes (es decir, seronegativas a HCMV) después de administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína IL-10 de citomegalovirus o su fragmento, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación; reducciones en la excreción de HCMV (es decir, eliminación) en contactos cercanos (por ejemplo, hijos, parejas) de mujeres embarazadas después de administrar al sujeto que disemina potencialmente HCMV una cantidad efectiva de una proteína IL-10 de citomegalovirus o su fragmento, una
- 65

molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación; y aumentar los títulos de anticuerpos que neutralizan la función de cmvIL-10 en mujeres inmunes (es decir, seropositivas a HCMV) después de administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína IL-10 de citomegalovirus o su fragmento, una molécula de ácido nucleico, un vector y/o una composición de esta invención, en cualquier combinación.

Los métodos para tratar o prevenir la infección causada por citomegalovirus en un sujeto pueden realizarse, por ejemplo, al contactar una célula inmunitaria del sujeto con cualquiera de los polipéptidos, fragmentos, moléculas de ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención.

Por lo tanto, los métodos para prevenir la infección causada por citomegalovirus en un sujeto descritos en la presente descripción pueden realizarse, por ejemplo, mediante la captación de cualquiera de los polipéptidos, fragmentos, moléculas de ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención por una célula profesional presentadora de antígeno (es decir, una célula dendrítica, macrófago, o célula B) para activar células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para el antígeno, y las células B específicas para el antígeno, que expresan el MHC clase I y clase II, y moléculas coestimuladoras en la superficie de la célula.

Los métodos para tratar la infección causada por citomegalovirus en un sujeto descritos en la presente descripción pueden realizarse, por ejemplo, mediante la captación de cualquier de los polipéptidos, fragmentos, moléculas de ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención por células para activar células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para el antígeno, y las células B específicas para el antígeno. La célula puede ser, por ejemplo, una célula T CD8⁺ que se pone en contacto con el polipéptido y/o fragmento de esta invención en presencia de una molécula del MHC clase I, que puede ser una molécula soluble o puede estar presente en la superficie de una célula que expresa moléculas del MHC clase I. La célula puede ser también cualquier célula que pueda captar y expresar un ácido nucleico exógeno y producir los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención.

En algunas modalidades, los polipéptidos de esta invención pueden producirse por una célula que los secreta, de manera que el polipéptido y/o fragmento se produce y se secreta y después se capta y subsecuentemente se procesa por una célula presentadora de antígeno u otra célula que expresa el MHC clase I y se presenta al sistema inmunitario para la inducción de una respuesta inmunitaria. En otras modalidades, los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención pueden introducirse directamente en una célula presentadora de antígeno y/o otra célula que expresa el MHC clase I en la cual el polipéptido y/o fragmento se produce y se procesa directamente y se presenta al sistema inmunitario en la superficie de la célula.

Como se estableció anteriormente, se contempla que en los métodos en donde la proteína IL-10 de CMV, las moléculas de ácido nucleico, vectores y/o composiciones de esta invención se administran a un sujeto o a una célula de un sujeto, tales métodos descritos en la presente descripción pueden comprender además la etapa de administrar un adyuvante adecuado al sujeto o a una célula del sujeto. El adyuvante puede estar en la composición de esta invención o el adyuvante puede estar en una composición separada que comprende un adyuvante adecuado y un portador aceptable farmacéuticamente. El adyuvante puede administrarse antes de, simultáneo con, y/o después de la administración de cualquiera de los polipéptidos, fragmentos, ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención. Por ejemplo, QS-21, similar a la alúmina, adyuvante de Freund completo, SAF, etc., puede administrarse dentro de días/semanas/horas (antes o después) de la administración de los polipéptidos, fragmentos, ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención. La efectividad de un adyuvante puede determinarse al medir la respuesta inmunitaria dirigida contra el polipéptido y/o fragmento de esta invención con y sin el adyuvante, mediante el uso de procedimientos estándar, como se describe en la presente descripción y como se conocen bien en la técnica.

El sujeto de esta invención puede ser cualquier sujeto en necesidad de la respuesta inmunitaria de esta invención y/o en necesidad del tratamiento para o la prevención de la infección por citomegalovirus, así como también cualquier sujeto en el que se desee inducir una respuesta inmunitaria a citomegalovirus. Tal sujeto puede ser cualquier tipo de animal que sea susceptible a la infección por citomegalovirus, u otro virus que expresa una proteína IL-10 viral, de esta invención, así como también cualquier animal al cual las proteínas, sus fragmentos, moléculas de ácido nucleico y/o vectores de esta invención pueden administrarse de acuerdo con los métodos de esta invención. Por ejemplo, un animal de esta invención pueden incluir cualquier mamífero, tal como un macaco rhesus, mono verde africano, babuino, ratón, conejo, cabra, oveja, o caballo. En ciertas modalidades, el sujeto de esta invención es un humano.

Las composiciones de esta invención pueden administrarse a una célula de un sujeto o a un sujeto tanto *in vivo* como *ex vivo*. Para la administración a una célula del sujeto *in vivo*, así como también para la administración al sujeto, las composiciones de esta invención pueden administrarse oralmente, parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente), por inyección intramuscular, por inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, transdérmicamente, transmucosalmente, intranasalmente, extracorpóreamente, tópicamente o similares. Además, las composiciones de esta invención pueden pulsarse en las células dendríticas, que se aíslan o crecen a partir de las células de un sujeto, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, o en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en masa o varias de sus subfracciones celulares de un sujeto.

La cantidad exacta de la proteína IL-10 de citomegalovirus, molécula de ácido nucleico, vector y/o composición de esta invención requerida variará de sujeto a sujeto, en dependencia de las especies, edad, peso y condición general del sujeto,

la proteína IL-10 de citomegalovirus o su fragmento, molécula de ácido nucleico, vector y/o composición particular usada, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada proteína IL-10 de citomegalovirus, molécula de ácido nucleico, vector y/o composición de esta invención. Sin embargo, una cantidad efectiva puede determinarse por el experto en la técnica mediante el uso de sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en la presente descripción.

Como un ejemplo, a un sujeto en el que se desea inducir una respuesta inmunitaria a citomegalovirus, de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 10 µg/kg de un polipéptido y/o fragmento de esta invención puede administrarse por diferentes vías, que incluyen pero no se limita a subcutánea, intramuscular, intradermal, transcutánea, intranasal, y/o transmucosa, y puede estar opcionalmente en un adyuvante, a intervalos de horas, diariamente y/o semanalmente intervalos hasta que una evaluación de los parámetros clínicos del sujeto indique que el sujeto muestra la respuesta inmunológica deseada. Alternativamente, un polipéptido de esta invención puede pulsarse en las células dendríticas en una concentración de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 10 mg por 10⁶ células dendríticas, y las células dendríticas pueden administrarse al sujeto intradermalmente y/o subcutáneamente en los mismos intervalos de tiempo. El tratamiento puede continuarse o reanudarse si los parámetros clínicos del sujeto lo justifican y/o hasta que se alcance la respuesta inmunológica deseada.

Si se emplean métodos *ex vivo*, las células o tejidos pueden eliminarse y mantenerse fuera del cuerpo del sujeto de acuerdo con protocolos estándar bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico de esta invención pueden introducirse a las células a través de mecanismos conocidos para la captación de polipéptidos en las células (por ejemplo, fagocitosis, pulsar en células que expresan el MHC clase I, liposomas, etc.). Las células pueden perfundirse (por ejemplo, en un portador aceptable farmacéuticamente) o trasplantarse de nuevo al sujeto por métodos estándar para el tipo de célula o tejido. Los métodos estándar se conocen para el trasplante o perfusión de varias células en un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen aquellas adecuadas para la administración por vía oral, rectal, tópica, inhalación (por ejemplo, por medio de un aerosol) bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleurar, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o intravenosa), tópica (es decir, superficies de la piel y las mucosas, que incluyen las superficies de las vías respiratorias) y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá, como se conoce bien en la técnica, de tales factores como la especie, edad, género y condición general del sujeto, de la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar y/o de la naturaleza de la composición particular (es decir, dosificación, formulación) a administrar.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sobres, pastillas, o tabletas, que contienen cada una una cantidad predeterminada de los conjugados de fármaco de insulina y oligómero; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. El suministro oral puede realizarse al formar complejos de una composición de la presente invención con un portador capaz de soportar la degradación de las enzimas digestivas en la cavidad oral y/o intestino de un animal. Ejemplos de tales portadores incluyen cápsulas o tabletas plásticas, como se conoce en la técnica. Tales formulaciones se preparan por cualquier método adecuado de farmacia, que incluye la etapa de poner en asociación la composición y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se señaló anteriormente). En general, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con las modalidades de la presente invención se preparan por mezcla uniforme e íntima de la composición con un portador sólido finamente dividido o líquido, o ambos, y después, si es necesario, conformando la mezcla resultante. Por ejemplo, una tableta puede prepararse mediante la compresión o el moldeo de un polvo o gránulos que contienen la composición, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se preparan al comprimir, en una máquina adecuada, la composición en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con agentes aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes y/o tensoactivos/dispersantes. Las tabletas moldeadas se fabrican por moldeo, en una máquina adecuada, del compuesto en polvo humedecida con un aglutinante líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen pastillas que comprenden la composición de esta invención en una base saborizada, que usualmente es sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden la composición en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas de esta invención para la administración parenteral pueden comprender soluciones de inyección acuosas y no acuosas estériles de la composición de esta invención, cuyas preparaciones son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la composición isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones acuosas y no acuosas estériles pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los portadores parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, aceites fijos y de Ringer lactato. Los portadores intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampulas y frascos sellados, y pueden almacenarse en una condición seca por congelación (liofilizada) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes del uso.

Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición estéril inyectable, estable, de esta invención en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. La composición puede proporcionarse en la forma de un liofilizado, que es capaz de reconstituirse con un portador adecuado farmacéuticamente aceptable para formar una composición líquida adecuada para inyectar en un sujeto. La forma de dosificación unitaria puede ser de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 gramo de la composición de esta invención. Cuando la composición es sustancialmente insoluble en agua, una cantidad suficiente de agente emulsionante, que es fisiológicamente aceptable, puede incluirse en cantidad suficiente para emulsionar la composición en un portador acuoso. Uno de tales agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal se presentan preferentemente como supositorios de dosis unitaria. Estos pueden prepararse mediante la mezcla de la composición con uno o más portadores sólidos convencionales, tal como, por ejemplo, manteca de cacao, y después conformando la mezcla resultante.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas de esta invención para la aplicación tópica a la piel toman preferentemente la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, rocío, aerosol, o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, gelatina de petróleo, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de estos. En algunas modalidades, por ejemplo, el suministro tópico puede realizarse al mezclar una composición farmacéutica de la presente invención con un reactivo lipofílico (por ejemplo, DMSO) que es capaz de pasar a la piel.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden estar en la forma de parches discretos que se adaptan para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del sujeto durante un período de tiempo prolongado. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica pueden suministrarse también, por iontoforesis (ver, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3:318 (1986)) y adoptarán, típicamente, la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada de la composición de esta invención. Las formulaciones adecuadas pueden comprender citrato o tampón bis\tris (pH 6) o etanol/agua. La presente invención proporciona además un medicamento y la preparación del mismo para uso en tratar y/o prevenir la enfermedad y trastornos descritos en la presente descripción mediante el empleo de las mismas etapas como se describe en los métodos descritos en la presente descripción. Se contempla además que los métodos, composiciones y medicamentos de esta invención pueden usarse para la aplicación veterinaria, así como también en aplicaciones que involucren humanos.

Además, las moléculas de ácido nucleico y vectores de esta invención pueden administrarse oralmente, intranasalmente, parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente), por inyección intramuscular, por inyección intraperitoneal, transdérmicamente, transmucosalmente, extracorpóreamente, tópicamente o similares. En los métodos descritos en la presente descripción que incluyen la administración y captación de ácido nucleico exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección de genes), las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en la forma de ácido nucleico desnudo o las moléculas de ácido nucleico pueden estar en un vector para suministrar las moléculas de ácido nucleico a las células para la expresión de los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención. En algunas modalidades, el vector puede ser una preparación disponible comercialmente o puede construirse en el laboratorio de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En modalidades adicionales, el vector puede ser un vector viral, como se conoce bien en la técnica.

El suministro de la molécula de ácido nucleico y/o vector de esta invención a las células puede ser a través de una variedad de mecanismos que se conocen bien en la técnica. Como un ejemplo, el suministro puede ser a través de un liposoma, mediante el uso de preparaciones de liposomas disponibles comercialmente tal como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como también otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos estándar en la técnica. Además, la molécula de ácido nucleico y/o vector de esta invención puede suministrarse *in vivo* mediante electroporación, la tecnología para lo cual está disponible de Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como también por medio de una máquina de SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

En modalidades particulares como se describe en la presente descripción, el suministro del vector puede ser a través de un sistema viral, tal como un sistema de vector retroviral, que puede empaquetar un genoma retroviral recombinante. El retrovirus recombinante puede usarse después para infectar y de esta manera suministrar a las células infectadas moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido y/o fragmento de esta invención. El método exacto para introducir el ácido nucleico exógeno en células de mamífero no se limita a, por supuesto, al uso de vectores retrovirales. Otras técnicas disponibles ampliamente para este procedimiento que incluye el uso de vectores adenovirales, vectores alfavirales, vectores virales adenoasociados (AAV), vectores lentivirales, vectores retrovirales seudotipificados y vectores virales de vacuna, así como también cualquier otro vector viral conocido ahora o desarrollado en el futuro. También pueden usarse técnicas físicas de transducción, tal como suministro de liposomas y mecanismos de endocitosis mediada por

receptor y otros. Esta invención puede usarse en conjunto con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia de genes usados comúnmente.

5 Como un ejemplo no limitante, la molécula de ácido nucleico de esta invención puede suministrarse a las células de un sujeto en un vector de virus Ankara de vacuna modificado (MVA). La dosis para la administración de vectores basados en MVA a humanos puede variar típicamente de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 5×10^9 unidades formadoras de placa (pfu) por inyección.

10 Como otro ejemplo no limitante, la molécula de ácido nucleico de esta invención puede suministrarse a las células de un sujeto en un vector de adenovirus. La dosis para la administración de adenovirus a humanos puede variar de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{11} pfu por inyección.

15 En algunas modalidades, un sujeto recibirá una única inyección de un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico de esta invención. Si se necesitan inyecciones adicionales, pueden repetirse en intervalos de diariamente/semanalmente/mensualmente durante un período definido y/o hasta que se establezca la eficacia del tratamiento. Como se establece en la presente descripción, la eficacia del tratamiento puede determinarse al evaluar los síntomas y parámetros clínicos descritos en la presente descripción y/o al detectar una respuesta inmunológica deseada.

20 La cantidad exacta de la molécula de ácido nucleico y/o vector requerida variará de sujeto a sujeto, en dependencia de la especie, edad, peso y condición general del sujeto, la molécula de ácido nucleico y/o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada ácido nucleico o vector. Sin embargo, una cantidad apropiada se puede determinar por el experto en la técnica usando sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en la presente descripción.

25 En los métodos descritos en la presente descripción, ambas moléculas de ácido nucleico y/o vectores de esta invención, así como también la proteína IL-10 de citomegalovirus o sus fragmentos de esta invención pueden administrarse a un sujeto. En un ejemplo no limitante, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de esta invención puede administrarse al sujeto en una etapa de sensibilización y una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención puede administrarse al sujeto como una etapa de refuerzo. La estrategia sensibilización-refuerzo en humanos puede consistir, por ejemplo, de un ácido nucleico inicial que sensibiliza la inmunización seguido por una o más inmunizaciones de refuerzo a intervalos de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 semanas. Las inmunizaciones de refuerzo pueden comprender moléculas de ácido nucleico, proteínas, sus fragmentos, vectores y/o composiciones de esta invención en cualquier combinación. El tiempo exacto de inmunizaciones de refuerzo variará de sujeto a sujeto, en dependencia de la especie, edad, peso y condición general del sujeto, la proteína, su fragmento, molécula de ácido nucleico y/o vector particular usado, su modo de administración y similares. Además, la composición exacta del régimen de inmunización sensibilización-refuerzo variará de sujeto a sujeto, en dependencia de la especie, edad, peso y condición general del sujeto, la proteína, su fragmento, molécula de ácido nucleico y/o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar un tiempo exacto para cada inmunización de refuerzo, y para la composición exacta de las inmunizaciones de sensibilización y refuerzo. Sin embargo, un experto en la técnica puede determinar un programa y composición adecuados de las inmunizaciones de sensibilización y refuerzo mediante el uso de sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en la presente descripción.

45 En ciertas modalidades, los polipéptidos de esta invención pueden fusionarse con una proteína o péptido "portador" para producir una proteína de fusión. Tal fusión puede realizarse, por ejemplo, mediante la unión de un ácido nucleico de esta invención en marco con un ácido nucleico que codifica una proteína portadora o su fragmento de esta invención y expresar la secuencia de nucleótidos unida para producir la proteína de fusión. Por ejemplo, la proteína o péptido portador pueden fusionarse a un polipéptido y/o fragmento de esta invención para aumentar la estabilidad de este (por ejemplo, al disminuir la velocidad de recambio) en la célula y/o sujeto. Las proteínas portadoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, la glutatión-S-transferasa o proteína de unión a maltosa. La proteína o péptido portador puede ser alternativamente una proteína reportera. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido y/o fragmento de esta invención y una proteína o péptido reportero (*por ejemplo*, proteína verde fluorescente (GFP), β -glucoronidasa, β -galactosidasa, luciferasa, y similares) para la detección fácil de las células transformadas y la expresión del transgén. Cualquier proteína portadora adecuada y/o ácido nucleico que codifica la proteína portadora, como se conoce bien en la técnica puede usarse para producir una proteína de fusión de esta invención.

55 La presente invención proporciona además una proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención como parte de un conjugado, por ejemplo, para mejorar o potenciar propiedades fisiológicas de la proteína o fragmento, tal como la solubilidad o el tiempo de vida media. El término "conjugado" (o indistintamente "polipéptido conjugado") pretende indicar una molécula heterogénea (en el sentido de compuesta o quimérica) formada por la unión covalente de uno o más polipéptido(s) a una o más porciones no polipeptídicas tal como moléculas de polímeros, compuestos lipofílicos, porciones de azúcar o agentes orgánicos derivados. Preferentemente, el conjugado es soluble a concentraciones y condiciones relevantes, es decir, soluble en fluidos fisiológicos tal como la sangre. Ejemplos de polipéptidos conjugados de la invención incluyen polipéptidos glicosilados y/o PEGilados.

65 El término "unión covalente" significa que la porción de polipéptido y no polipeptídica se unen ya sea covalentemente directamente uno con otro, o bien se unen covalentemente indirectamente uno con otro a través de una porción o

porciones de intervención, tales como un puente, separador, o porción o porciones de enlace. El término "polipéptido no conjugado" puede usarse para referirse a la parte de polipéptido del conjugado.

Cuando se usa en la presente descripción, el término "porción no polipeptídica" se refiere a una molécula que es capaz de conjugarse a un grupo de unión del polipéptido de la invención. Ejemplos adecuados de tales moléculas incluyen moléculas de polímeros, porciones de azúcar, compuestos lipofílicos, o agentes de derivación orgánica. Cuando se usa en el contexto de un conjugado de la invención se entenderá que la porción no polipeptídica se enlaza a la parte de polipéptido del conjugado a través de un grupo de unión del polipéptido. Como explicado anteriormente, la porción no polipeptídica se puede unir covalentemente directamente al grupo de unión, o se puede unir covalentemente indirectamente al grupo de unión a través de una porción o porciones de intervención, tales como un puente, separador, o porción o porciones de enlace.

La presente invención además incluye polipéptidos, péptidos, proteínas, fragmentos, dominios y/o moléculas de ácido nucleico aisladas que son sustancialmente equivalentes a aquellos descritos por esta invención. Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente equivalentes" puede referirse a secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos, por ejemplo una secuencia mutante, que varía de una secuencia de referencia por una o más sustituciones, deleciones, o adiciones, el efecto neto de las cuales no resulta en una diferencia funcional no deseada entre las secuencias de referencia y del sujeto. En algunas modalidades, esta invención puede incluir sustancialmente secuencias equivalentes que tienen una diferencia funcional adversa. Para los propósitos de la presente invención, las secuencias que tienen actividad biológica equivalente y características equivalentes de expresión se consideran sustancialmente equivalentes.

Se describen homólogos, así como también métodos para obtener homólogos, de los polipéptidos de esta invención a partir de otro citomegalovirus, así como también otros herpesvirus. Como se usa en la presente descripción, una secuencia de aminoácidos o proteína se define como un homólogo de un polipéptido o fragmento de la presente invención si comparte homología significativa con uno de los polipéptidos y/o fragmentos de la presente invención. Homología significativa quiere decir al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % y/o 100 % de homología con otra secuencia de aminoácidos. Específicamente, mediante el uso de los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción como una sonda o como cebadores, y técnicas como amplificación por PCR e hibridación colonia/placa, un experto en la técnica puede identificar los homólogos de los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención en cualquier otro virus.

Se describe un kit que comprende el polipéptido cmvIL-10, la molécula de ácido nucleico, vector y/o anticuerpo de esta invención, junto con reactivos, tampones, diluyentes, dispositivos y/o instrumentos, etc., para facilitar el uso del polipéptido cmvIL-10, su fragmento, molécula de ácido nucleico y/o vector de esta invención en métodos descritos en la presente descripción. Se entenderá bien por un experto en la técnica que los kits pueden comprender uno o más contenedores y/o receptáculos para mantener los reactivos (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, fragmentos, ácidos nucleicos, vectores, etc.) del kit, junto con los tampones y/o diluyentes apropiados e instrucciones para el uso del kit, como se conoce bien en la técnica. Tales kits pueden comprender además adyuvantes y/u otros agentes inmunoestimuladores o inmunomoduladores, como se conocen bien en la técnica.

También se describe en la presente descripción un método para prevenir o mejorar una infección por citomegalovirus en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo específicamente reactivo contra una proteína IL-10 de citomegalovirus.

Además, se describe en la presente descripción un método para reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en una mujer que está embarazada y desarrolla o está en riesgo de desarrollar una infección primaria, no primaria, o reactivada de CMV, así como también un método para prevenir o mejorar una infección por citomegalovirus en tal sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo específicamente reactivo contra una proteína IL-10 de citomegalovirus. En algunas modalidades, el anticuerpo específicamente bloquea la actividad funcional de IL-10 de citomegalovirus.

Además, se describe en la presente descripción un método para reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un sujeto que es un receptor de trasplante, un sujeto inmunocomprometido, y/o un sujeto inmunodeprimido, así como también un método para prevenir o mejorar una infección por citomegalovirus en tal sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo específicamente reactivo contra una proteína IL-10 de citomegalovirus. En algunas modalidades, el anticuerpo específicamente bloquea la actividad funcional de IL-10 de citomegalovirus.

En ciertas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción que emplean un anticuerpo, el sujeto puede ser un humano y el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado.

Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulinas intactas, así como también sus fragmentos que son capaces de unirse al determinante epitópico de un antígeno (es decir, determinante antigénico). Los anticuerpos que unen los polipéptidos de esta invención se preparan mediante el uso de polipéptidos o fragmentos intactos como el antígeno de inmunización. El polipéptido o fragmento usado para inmunizar un animal puede derivarse a partir de la escisión enzimática, expresión recombinante, aislamiento a partir de materiales biológicos, síntesis, etc., y puede conjugarse a una proteína portadora, si se desea. Los portadores usados comúnmente que se acoplan

químicamente a péptidos y proteínas para la producción de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de la lapa californiana. El péptido o proteína acoplado se usa después para inmunizar el animal (por ejemplo, un ratón, rata, o conejo). Los antígenos de polipéptido o péptido pueden también administrarse con un adyuvante, como se describe en la presente descripción y como se conoce de cualquier otra manera en la técnica.

5 Un anticuerpo de esta invención puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina, que incluye IgG, IgM, IgA, IgD, y/o IgE. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede ser de cualquier origen de especie, que incluye, por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o humano, o puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, Walker y otros, *Molec. Immunol.* 26:403-11 (1989)). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes
10 producidos de acuerdo con los métodos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 4,474,893 o en la patente de Estados Unidos núm. 4,816,567. Los anticuerpos pueden construirse también químicamente de acuerdo con métodos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 4,676,980. El anticuerpo puede ser además un anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv) o anticuerpo biespecífico.

15 Los fragmentos de anticuerpo incluidos dentro del alcance de la presente invención incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, y Fc, y los fragmentos correspondientes obtenidos a partir de anticuerpos distintos a IgG. Tales fragmentos pueden producirse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab pueden construirse para permitir una
20 identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse y otros, (1989) *Science* 254:1275-1281). Los anticuerpos pueden obtenerse también mediante técnicas de presentación en fagos conocidas en la técnica o mediante la inmunización de un huésped heterólogo con una célula que contiene un epítipo de interés.

25 El polipéptido, fragmento o epítipo antigénico que se usa como un inmunógeno puede modificarse o administrarse en un adyuvante para aumentar su antigenicidad. Los métodos para aumentar la antigenicidad de una proteína o péptido se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, acoplar el antígeno con una proteína heteróloga (tal como globulina o β -galactosidasa) o a través de la inclusión de un adyuvante durante la inmunización.

30 Por ejemplo, para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse varios huéspedes que incluyen cabras, conejos, ratas, ratones, humanos, y otros, mediante inyección con los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención, con o sin una proteína portadora. Adicionalmente, pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de Freund completos e incompletos, geles minerales tal como hidróxido de aluminio, y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, pluronicpolioles, polianiones, péptidos, emulsiones aceitosas, hemocianina de la lapa californiana, y dinitrofenol. Entre los adyuvantes usados en humanos, son especialmente preferidos BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en una línea celular de hibridoma de acuerdo con la técnica de Kohler y Milstein (*Nature* 265:495-97 (1975)). Otras técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales incluyen, pero no
40 se limitan a, la técnica de hibridoma de células B humanas, y la técnica de hibridoma EBV (Kozbor y otros 1985. *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote y otros 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; Cole y otros 1984. *Mol. Cell Biol.* 62:109-120), así como también las tecnologías de presentación en fagos (Bradbury y otros *Nat. Biotechnol* 29(3):245-254(2011)).

45 Por ejemplo, para producir anticuerpos monoclonales, puede inyectarse a un ratón una solución que contiene el antígeno apropiado y, después de un tiempo suficiente, el ratón se sacrifica y se obtienen las células del bazo. Las células del bazo después se immortalizan al fusionarlas con células de mieloma o con células de linfoma, típicamente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Las células de hibridoma se cultivan luego en un medio adecuado y el sobrenadante se tamiza en búsqueda de anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada. Los fragmentos monoclonales Fab pueden producirse en una célula bacteriana tal como *E. coli* mediante técnicas recombinantes
50 conocidas por un experto en la técnica (por ejemplo, Huse, *Science* 246:1275-81 (1989)). Puede usarse cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la técnica para identificar la célula del hibridoma, que produce un anticuerpo con las características deseadas. Estos incluyen tamizar los hibridomas por ensayo de ELISA, análisis de transferencia Western, o radioinmunoensayo. Los hibridomas que secretan los anticuerpos deseados se clonan y se identifican la clase y subclase mediante el uso de procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Para los anticuerpos policlonales, se aísla el suero que contiene los anticuerpos a partir del animal inmunizado y se tamiza para detectar la presencia de anticuerpos con la especificidad deseada mediante el uso de cualquiera de los procedimientos bien conocidos como se describe en la presente descripción.

60 Además, pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados mediante el corte y empalme de genes de anticuerpo de ratón con genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con una especificidad de antígeno y actividad biológica apropiada (Morrison y otros 1984 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855; Neuberger y otros 1984 *Nature* 312:604-608; Takeda y otros 1985 *Nature* 314:452-454).
65 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única pueden adaptarse, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, para producir anticuerpos de cadena única específicos para los polipéptidos

y fragmentos de esta invención. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de composición idiotípica distinta, pueden generarse por intercambio de cadena a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas combinatorias al azar (Burton 1991. Proc. Natl. Acad. Sci.88:11120-3).

5 En algunas modalidades, los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse por amplificación por PCR-transcripción inversa de las cadenas pesadas y ligeras de los genes variables de las células B específicas para cmvIL-10 a partir de humanos infectados con HCMV. Los amplicones se clonan subsecuentemente en marco en vectores de expresión que contienen el promotor/potenciador inmediato-temprano de HCMV que dirige la expresión de (en orden y en marco) una secuencia murina de péptido señal de inmunoglobulina, sitios de clonación apropiados para los genes variables de cadena pesada y ligera, las regiones constantes de las inmunoglobulinas humanas que contienen codones de parada de la traducción, y una secuencia de poliadenilación de SV40 aguas abajo del codón de terminación de la traducción. (Wrammert y otros 2011. J. Exp. Med. 208:181-93; Smith y otros 2009. Nat. Protocol. 4:372-84).

15 Pueden usarse varios inmunoensayos para el tamizaje de identificar los anticuerpos que tienen la especificidad deseada por las proteínas y péptidos de esta invención. Se conocen bien en la técnica numerosos protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales con especificidad establecida. Tales inmunoensayos típicamente involucran la medición de formación de complejos entre un antígeno y su anticuerpo específico (por ejemplo, formación de complejo antígeno/anticuerpo). Por ejemplo, puede usarse un inmunoensayo de dos sitios, basado en monoclonal que usa anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes en las proteínas o péptidos de esta invención, así como también un ensayo de unión competitiva.

Definiciones

25 Como se usa en la presente descripción, "un" o "una" o "el/la" puede significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una célula o una pluralidad de células.

Además, como se usa en la presente descripción, "y/o" se refiere y abarca a todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

30 Además, el término "aproximadamente" como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto o agente de esta invención, dosis, tiempo, temperatura, y similares, abarca variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

35 Un citomegalovirus de esta invención incluye, pero no se limita a un citomegalovirus de humano (herpesvirus de humano 5), citomegalovirus de rhesus (herpesvirus de macaco 3), citomegalovirus de mono verde africano (también referido comúnmente como citomegalovirus de simio, citomegalovirus vervet, virus sigiloso 1; herpesvirus de Cercopitecinos 5), herpesvirus de babuino, y cualquier otro citomegalovirus, conocido ahora o identificado después.

40 La proteína IL-10 de citomegalovirus de esta invención es una proteína IL-10 o su ortólogo de un citomegalovirus de esta invención. El gen de IL-10 de citomegalovirus humano codifica una proteína de 176 aminoácidos (por ejemplo, Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AAF63437; cepa Towne) (SEQ ID NO:3). El gen de IL-10 de citomegalovirus de rhesus codifica una proteína de 189 aminoácidos [por ejemplo, Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AAF59907 (Cepa 68-2) (SEQ ID NO:1); Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AAF61204 (Cepa MMU28684) (SEQ ID NO:2)].

50 Esta invención abarca además una proteína IL-10 producida por virus distintos a citomegalovirus, que incluyen, pero no se limita a virus Epstein-Barr (herpesvirus humano 4), herpesvirus ovino 2, herpesvirus equino 2 (herpesvirus équido 2), linfocriptovirus de rhesus (herpesvirus macacos 4), así como también cualquier otro virus conocido ahora o identificado después para producir una proteína IL-10 o similar a IL-10.

Como se usa en la presente descripción, "modulan," "modula" o "modulación" se refiere a la potenciación (por ejemplo, un aumento) o inhibición (por ejemplo, disminuida, reducida o suprimida) de la actividad especificada.

55 El término "potenciación," "potencian," "potencia," o "que potencia" se refiere a un aumento en el parámetro especificado (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,25 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, doce veces, o incluso quince veces o más aumento) y/o un aumento en la actividad especificada de al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 25 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

60 El término "inhibir," "disminuir," "reducir" o "suprimir" se refiere a una disminución en el parámetro especificado (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,25 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, doce veces, o incluso quince veces o más aumentos) y/o una disminución o reducción en la actividad especificada de al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 25 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En modalidades particulares, la inhibición o reducción resulta en poca actividad o esencialmente no

detectable (a lo máximo, una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de aproximadamente 10 % o aproximadamente 5 %).

Como se usa en la presente descripción, la frase de transición "que consiste esencialmente en" significa que el alcance de una reivindicación es para interpretarse que abarca los materiales o etapas especificados en la reivindicación, "aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada. Ver, *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); ver además MPEP § 2111.03. Por lo tanto, el término "que consiste esencialmente" en cuando se usa en una reivindicación de esta invención no pretende que se interprete como equivalente a "que comprende."

"Aislado" como se usa en la presente descripción significa el ácido nucleico o proteína o fragmento de proteína de esta invención que está suficientemente libre de contaminantes o componentes celulares con los cuales se encuentran normalmente los ácidos nucleicos o proteínas. "Aislado" no significa que la preparación está técnicamente pura (homogénea), pero está suficientemente pura para proporcionar el ácido nucleico o proteína o fragmento de proteína en una forma en la que puede usarse terapéuticamente.

"Epítipo" o "epítipo antigénico" o "péptido antigénico" como se usa en la presente descripción significa una secuencia de aminoácidos específica que, cuando se presenta en la conformación correcta, proporciona un sitio reactivo para un anticuerpo o receptor de célula T. La identificación de los epítopos en antígenos puede realizarse mediante protocolos de inmunología que se conocen bien en la técnica. Típicamente, un epítipo o péptido antigénico puede ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud.

Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido" o "proteína" se usa para describir una cadena de aminoácidos que corresponde a aquella codificada por un ácido nucleico. Un polipéptido de esta invención puede ser un péptido, que usualmente describe una cadena de aminoácidos de desde dos a aproximadamente 30 aminoácidos. El término polipéptido como se usa en la presente descripción describe también una cadena de aminoácidos que tiene más de 30 aminoácidos y puede ser un fragmento o dominio de una proteína o una proteína de longitud completa. Además, como se usa en la presente descripción, el término polipéptido puede referirse a una cadena de aminoácidos lineal o puede referirse a una cadena de aminoácidos que se ha procesado y plegado en una proteína funcional. Se entiende, sin embargo, que 30 es un número arbitrario con respecto a péptidos y polipéptidos distintivos y los términos pueden usarse indistintamente para una cadena de aminoácidos. Los polipéptidos de la presente invención se obtienen por aislamiento y purificación de los polipéptidos a partir de las células donde se producen naturalmente, por escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica), y/o recombinantemente por expresión del ácido nucleico que codifica los polipéptidos o fragmentos de esta invención. Los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención pueden obtenerse también por síntesis química u otros protocolos conocidos para producir polipéptidos y fragmentos.

Las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción se representan en la dirección amino a carboxilo, de izquierda a derecha. Las secuencias de nucleótidos se representan en la presente descripción en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha. Se pretende que los ácidos nucleicos de esta invención puedan ser de cadena sencilla o doble (es decir, que incluye el ácido nucleico complementario). Un ácido nucleico de esta invención puede ser el complemento de un ácido nucleico descrito en la presente descripción.

Un "fragmento" como se usa en la presente descripción incluye un polipéptido de esta invención que comprende un número suficiente de aminoácidos para tener una o más de las actividades biológicas de los polipéptidos de esta invención. Tales actividades biológicas pueden incluir, pero no se limitan a actividad inmunogénica, así como también cualquier otra actividad conocida ahora o identificada después para los polipéptidos y/o fragmentos de esta invención. Un fragmento de un polipéptido de esta invención puede producirse mediante métodos bien conocidos y de rutina en la técnica. Los fragmentos pueden producirse, por ejemplo, por escisión enzimática u otra de péptidos o polipéptidos presentes de manera natural o por protocolos sintéticos que se conocen bien. Tales fragmentos pueden probarse para una o más de las actividades biológicas de esta invención de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, que son métodos de rutina para probar las actividades de polipéptidos, y/o de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica y de rutina para identificar tales actividades. Tal producción y prueba para identificar los fragmentos de los polipéptidos descritos en la presente descripción estarían bien dentro del alcance de un experto en la técnica y serían de rutina.

Los fragmentos de los polipéptidos de esta invención son preferentemente al menos aproximadamente de diez aminoácidos de longitud y conservan las actividades inmunológicas de la proteína IL-10 de CMV. Ejemplos de fragmentos incluyen, pero no se pretende limitarse a, los fragmentos siguientes identificados por el número de aminoácidos como se muestra para las secuencias de aminoácidos respectivas de SEQ ID NOs: 1, 2 y 3: aminoácidos 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 165-176, 1-25, 1-50, 1-67, 1-75, 1-100, 1-125, 1-135, 1-145, 1-150, 1-160, 1-170, 1-180, etc.

Se entiende que esta lista es sólo ilustrativa y que un fragmento puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que contiene cualquier combinación de aminoácidos contiguos que se enumeran en el Listado de Secuencias como aminoácidos 1 a 176 (SEQ ID NO:3) o aminoácidos 1 a 189 (SEQ ID NO:1 o 2) incluso si esa combinación no se menciona específicamente como un ejemplo en la presente descripción. También se entiende que estos fragmentos pueden

combinarse en cualquier orden o cantidad. Por ejemplo, el fragmento 1-10 puede combinarse con el fragmento 10-20 para producir un fragmento de aminoácidos 1-20. Como otro ejemplo, el fragmento 1-20 puede combinarse con el fragmento 50-60 para producir un fragmento único de esta invención que tiene 31 aminoácidos (AA 1-20 y AA 50-60). También los fragmentos pueden presentarse en números múltiples y en cualquier combinación en un fragmento de esta invención. Por lo tanto, por ejemplo, el fragmento 1-150 puede combinarse con un segundo fragmento 1-150 y/o combinarse con el fragmento 135-170 para producir un fragmento de esta invención.

Los términos "homología," "identidad" y "complementariedad" como se usa en la presente descripción se refieren a un grado de similitud entre dos o más secuencias. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia complementaria parcialmente que inhibe al menos parcialmente una secuencia idéntica a partir de la hibridación con un ácido nucleico objetivo se refiere como "sustancialmente homóloga." La inhibición de la hibridación de la secuencia complementaria completamente con la secuencia objetivo puede examinarse mediante el uso de un ensayo de hibridación (Transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia sustancialmente homóloga o una sonda de hibridación competirá por e inhibirá la unión de una secuencia homóloga completamente al secuencia objetivo bajo condiciones de baja rigurosidad, según se conoce este término en la técnica. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad son tales que se permite la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede probarse por el uso de una segunda secuencia objetivo que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de aproximadamente 30 % de identidad). En ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará con la segunda secuencia objetivo no complementaria.

El término "hibridación" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier proceso por el cual una primera hebra de ácido nucleico se une con una segunda hebra de ácido nucleico mediante el apareamiento de bases. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de esta invención pueden detectarse por hibridación y/o amplificación de ADN-ADN, ADN-ARN, o ARN-ARN mediante el uso de sondas, cebadores y/o fragmentos de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de esta invención y/o diseñados para detectar y/o amplificar los ácidos nucleicos de esta invención.

El término "complejo de hibridación" como se usa en la presente descripción se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácido nucleico por la formación de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias G y C y entre bases complementarias A y T; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse además por interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias complementarias de ácidos nucleicos forman los enlaces de hidrógeno en una configuración antiparalela. Un complejo de hibridación puede formarse en solución (por ejemplo, análisis de Cot o Rot) o formarse entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido (por ejemplo, papel, membranas, filtros, chips, pasadores o láminas de vidrio, o cualquier otro sustrato apropiado al cual se han fijado las células y/o ácidos nucleicos).

El término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. Los términos "ácido nucleico," "molécula de ácido nucleico," "secuencia de nucleótidos," "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usa también indistintamente en la presente descripción para referirse a un heteropolímero de nucleótidos. Generalmente, los segmentos de ácido nucleico proporcionados por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos del genoma y enlazadores cortos de oligonucleótido, o a partir de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que es capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos regulatorios derivados de un operón microbiano o viral, o un gen eucariótico. Los ácidos nucleicos de esta invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en secuencia a la secuencia que está presente de manera natural o, debido a la bien caracterizada degeneración del código genético, pueden incluir codones alternativos que codifican los mismos aminoácidos que el que se encuentra la secuencia natural. Además, los ácidos nucleicos de esta invención pueden comprender secuencias de nucleótidos que pueden incluir codones que representan sustituciones conservativas de aminoácidos como se conocen bien en la técnica, de manera que la actividad biológica del polipéptido y/o fragmento resultante se conserva.

El término "sonda" o "cebador" incluye ácidos nucleicos presentes de manera natural y/o recombinante y/o químicamente sintetizado monocatenarios y/o bicatenarios. Ellos pueden marcarse para la detección mediante traducción de Nick, reacción de relleno de Klenow, PCR y/u otros métodos bien conocidos en la técnica. Las sondas y los cebadores de la presente invención, su preparación y/o marcado se describen en Sambrook y otros 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY and Ausubel y otros 1989. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York N.Y., los cuales se incorporan en la presente descripción mediante referencia en su totalidad para estas enseñanzas.

El término "riguroso" como se usa en la presente descripción se refiere a las condiciones de hibridación que se entienden comúnmente en la técnica para definir las condiciones del procedimiento de hibridación. Las condiciones de rigurosidad pueden ser bajas, altas o medias, según se conocen comúnmente esos términos en la técnica y se reconocen bien por un experto. En varias modalidades, las condiciones rigurosas pueden incluir, por ejemplo, condiciones altamente rigurosas (es decir, alta rigurosidad) (por ejemplo, hibridación en 0,5 M de NaHPO₄, 7 % de dodecil sulfato de sodio (SDS), 1 mM de EDTA a 65 °C, y lavado en 0,1xSSC/0,1 % de SDS a 68 °C), y/o condiciones moderadamente rigurosas (es decir, rigurosidad media) (por ejemplo, lavado en 0,2xSSC/0,1 % de SDS a 42 °C).

"Amplificación" como se usa en la presente descripción incluye la producción de múltiples copias de una molécula de ácido nucleico y se realiza generalmente mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o cualquier otra tecnología de amplificación como se conocen bien en la técnica (Dieffenbach y Dveksler. 1995. PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.).

El término "muestra" como se usa en la presente descripción se usa en su sentido más amplio. Una muestra biológica sospechosa de contener un polipéptido, fragmento, anticuerpo y/o ácido nucleico de esta invención puede ser cualquier fluido biológico, un extracto de una célula, una matriz extracelular aislada de una célula, una célula (en solución o unida a un soporte sólido), un tejido, una impresión de tejido, y similares. Una muestra de esta invención puede incluir también una sustancia que no se obtiene del cuerpo de un sujeto de esta invención. Ejemplos de una muestra incluyen, pero no se limitan a, una muestra acuosa o fluida, una muestra de alimento o productos alimenticios, una planta o muestra de material vegetal, una muestra de suelo o roca, un animal o muestra de material animal, una muestra de cama de animal, una muestra de jaula de animal, muestra de aire, una muestra de tierra o suciedad, una ropa, papel u otro material usado para cepillar, secar, sacudir o limpiar una superficie, una muestra de efluente, etc.

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos, que se pretenden sólo como ilustrativos debido a que numerosas modificaciones y variaciones de estos serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño de Mutantes de IL-10 de Citomegalovirus de Rhesus para usar en Estrategias de Vacunas

Resumen

El citomegalovirus de Rhesus (RhCMV) produce un homólogo de interleucina-10 (IL-10) celular (rhcmvIL-10) que bloquea las respuestas inmunitarias del huésped y contribuye al establecimiento de una infección persistente de RhCMV. La neutralización de la actividad de rhcmvIL-10 durante la infección puede potenciar la eliminación del virus. Basado en su baja identidad de secuencia con RhlL-10 celular (~26 %), rhcmvIL-10 puede ser útil como un antígeno en vacunas para RhCMV. Sin embargo, la inmunización con rhcmvIL-10 puede ser perjudicial para el huésped debido a sus actividades biológicas inmunosupresoras. Para superar este problema, la presente invención proporciona mutantes de rhcmvIL-10 modificados genéticamente que no pueden unirse al receptor IL-10R1 (IL-10R1) de la superficie de la célula y no inducen las actividades biológicas de IL-10. La inmunización de macacos rhesus con los mutantes inactivos de rhcmvIL-10 induce una respuesta inmunitaria contra la molécula rhcmvIL-10 nativa.

Células

Las células TF-1, transfectadas con el gen humano de IL-10R1 (TF-1/cIL-10R1, (Liu y otros, 1997)), se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Mediatech) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Biowhitaker), 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100uM de estreptomycin, 50µM de BME, 2 µg/ml de puromicina (Sigma), y 2 ng/ml de GM-CSF humano recombinante (sistemas R&D). Los PMBC de rhesus se mantuvieron en medio RPMI.

Clonación, expresión, y purificación de mutantes rhCMVIL-10 y rhCMVIL-10

Se amplificó el marco abierto de lectura de rhcmvIL-10 (Figura 2) (Lockridge y otros, 2000) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se insertó en el vector pMTA-V5-His6 (Invitrogen) para la expresión en células S2 de *Drosophila* como se describió previamente (Josephson y otros, 2001b). La rhcmvIL-10 se purificó por cromatografía de afinidad mediante el uso de perlas de IL-10R1 humano (Jones y otros, 2002). Para purificar los mutantes de rhcmvIL-10 que no pueden unirse a IL-10R1, se construyeron plásmidos de rhcmvIL-10 que codifican etiquetas de 6 histidinas en el N-terminal o C-terminal. Específicamente, los mutantes de rhcmvIL-10 etiquetados con histidina en el N-terminal se expresaron mediante el uso de una secuencia señal heteróloga de la cadena humana de IFNγR2, seguido por una etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal, seguido por un sitio de proteasa factor Xa (pAHF-rhcmvIL-10). Los mutantes de rhcmvIL-10 etiquetados con histidina en el C-terminal se expresaron mediante el uso de la secuencia señal de IFNγR2 y también contienen un sitio proteasa factor Xa en el C-terminal seguido por una etiqueta de 6 histidinas (PMTA-rhcmvIL-10FXH). Las secuencias de estos constructos finales de proteína se muestran en la presente descripción en las Alienaciones de Secuencias.

Las mutaciones se realizaron mediante el uso del kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange (Stratagene) y se confirmaron por secuenciación de ADN. La purificación a gran escala de los mutantes de rhcmvIL-10 se realizó mediante el uso de un protocolo de purificación por afinidad con níquel de 2 etapas. Los mutantes de 1 litro de medio de expresión se dializaron en tampón de unión (20mM de Tris pH 8,0, 500mM de NaCl, y 5mM de imidazol) y se unieron a 5 mL de resina de unión a Ni-NTA (Novagen). Las fracciones se eluyeron de la columna mediante el uso de tampón de unión + 200mM imidazol (~30 mL) se volvieron a dializar en tampón de unión y se purificaron de nuevo en una columna 0,5 mL de resina de Ni-NTA.

Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó mediante la inyección de muestras de proteína en una columna de filtración en gel Superdex 200 de 24 mL (GE Health Care).

5 Ensayo pull down

El medio de *Drosophila* (500 µL) que contiene proteínas rhcmvIL-10 expresadas transientemente se incubó con 15 µL de IL-10R1 humano acoplado a perlas de agarosa (Affi-gel 10, BioRad) durante 1 hora a 4 °C. Las perlas se recuperaron del medio mediante centrifugación a 400 x g y se lavaron 3 veces en 500 µL de tampón de lavado que consiste en 20mM de Tris-HCL, pH 8,0, 150mM de NaCl, 1 % de Tween-20. La proteína unida 15 µL de las perlas lavadas se añadió al tampón de muestra, se hirvió 5 minutos, y se cargó en un gel de SDS-PAGE al 12 %. La proteína se detectó mediante el uso de la tinción con azul Coomassie.

15 Transferencia Western

El medio de expresión de rhcmvIL-10 (10 µL) se corrió en un gel de SDS-PAGE al 12 %. Las proteínas rhcmvIL-10 se detectaron por transferencia western mediante el uso de un anticuerpo (Ab) primario de ratón anti-tetraHis (Qiagen), dilución 1:2000 en solución salina tamponada con Tris con Tween-20 (TBST) y 3 % de albúmina de suero bovino (BSA), seguido por un Ab secundario de ratón anti-caballo conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP), dilución 1:5000, en TBST y 1 % de leche (Amersham) para la detección por ECL.

Ensayo de proliferación celular TF-1/HuIL-10R1

La rhcmvIL-10 silvestre o mutantes de rhcmvIL-10 se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos (Becton Dickinson) en pocillos duplicados y se diluyeron tres veces en serie a través de las placas. Se añadieron 5000 células de TF-1/HuIL-10R1 a cada pocillo y se incubaron durante 2 días a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células viables se evaluaron mediante el uso de Azul Alamar (Biosource International/Invitrogen). La intensidad de la fluorescencia se midió a temperatura ambiente mediante el uso de un lector de placas POLARstar (BMG Lab Technologies) a longitudes de onda de excitación de 544 nm y emisión de 590 nm.

30 Ensayo de ELISA IL-12

Las microplacas de 96 pocillos (Immulon 4 HBX, Dynex Technologies, Inc.) se cubrieron con el par de anticuerpos IL-12 p40+p70 y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron después 6 veces con PBS-T y se incubaron con PBS/1 % de tampón de bloqueo BSA durante 1 hora a 37 °C. El tampón se eliminó, se añadieron 100 µL/pocillo de sobrenadante de PBMC, y la mezcla de células se incubó a 4 °C toda la noche. Las placas se lavaron después 6 veces con tampón de lavado PBS-T, se añadió 100 µL/pocillo de anticuerpo detector de ELISA pAb anti-mono, y las células se incubaron 1 hora a 37 °C. Después del lavado, se añadió 100 µL/pocillo de conjugado de polímero estreptavidina-HRP (SPP) (U-Cytech) y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, se añadió sustrato TMB (100 µL/pocillo) por pocillo, y las placas se incubaron a 25 °C durante 7-10 min. El desarrollo del color se detuvo por la adición de 0,5 M de ácido sulfúrico (50 µL/pocillo). Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, las placas se leyeron a una longitud de onda de 450nm en un lector de microplacas Modelo 680 (BioRad). Las concentraciones de IL-12 se cuantificaron mediante el uso de un estándar recombinante de IL-12 diluido 2 veces en serie que se incluyó en cada placa.

45 Estrategia de inmunización

Siete macacos rhesus seropositivos a RhCMV se inmunizaron con rhcmvIL-10. La inmunización consistió de tres inyecciones intramusculares (IM; 150 µg) e intradérmicas (ID; 50 µg) de ADN plasmídico que codifica rhcmvIL-10 M1 (3 animales) o rhcmvIL-10 M2 (3 animales) seguidas por dos refuerzos de proteína homóloga (50 µg IM adyuvada en Montanide ISA 720), de manera que los animales se inmunizaron (ADN y proteína) con sólo M1 o M2. Las segundas y terceras inyecciones de ADN se separaron de la inmunización anterior por 28 y 21 días, respectivamente. El primer refuerzo de proteína se inició 2 meses después de la tercera inyección de ADN y la segunda se realizó 1 mes después de la primera. El plasma se colectó semanalmente entre las inyecciones de ADN y proteína. Un séptimo animal sólo se inmunizó con el ADN plasmídico.

Análisis del plasma de rhesus para anticuerpos neutralizantes anti-rhcmvIL-10

El plasma, colectado entre inmunizaciones, se diluyó 1:4000 en RPMI y se incubó con 0,5 ng de rhcmvIL-10 durante 3 horas a 37 °C. El plasma se mezcló con 4x10⁵ PBMC de rhesus en un volumen total de 200 µL durante 30 minutos seguido por la adición de 1 µg de LPS y la incubación durante 24 horas. Los niveles de IL-12 se monitorearon mediante ELISA como se describe en la presente descripción. La producción de IL-12 se reporta como el % de aumento en comparación con la producción de IL-12 en PBMC estimuladas incubadas con plasma versus PBMC estimuladas incubadas con rhcmvIL-10 y plasma.

65 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas de cromatografía líquida (LCMS) de rhcmvIL-10FXH se realizó mediante el uso de un LC/MS ABSciexAPI 4000.

5 Expresión, purificación, y caracterización de rhcmvIL-10

La rhcmvIL-10 se expresó en células S2 Schneider de *Drosophila* y se purificó por cromatografía de afinidad mediante el uso de perlas de agarosa acopladas con la cadena humana de IL-10R1 como se describió anteriormente (Jones y otros, 2002). La rhcmvIL-10 purificada por afinidad corrió como dos bandas en los geles de SDS-PAGE. La banda principal exhibió un peso molecular (MW) de ~19 000, mientras que también se observó una segunda banda mucho menos intensa de ~18 000 (Figura 1). La presencia de dos bandas sugirió que la rhcmvIL-10, expresada en células de insecto, está predominantemente glicosilada en su sitio único de N-glicosilación, Asn-87 (Figura 2). Esto se confirmó subsecuentemente por espectrometría de masas de rhcmvIL-10FXH en presencia y ausencia de PNGasa F, que elimina enzimáticamente los glicanos N-unidos (Tabla 3). La rhcmvIL-10 purificada por afinidad se inyectó en una columna de filtración en gel (GF) (Figura 1). En el experimento de GF, rhcmvIL-10 eluyó de la columna en esencialmente la misma posición que la IL-10 humana celular (HuIL-10), que es un dímero (Walter y Nagabhushan, 1995; Windsor y otros, 1993; Zdanov y otros, 1995). Los resultados combinados de los datos de la SDS-PAGE y GF confirman que rhcmvIL-10WT es un homodímero no covalente, como se determinó anteriormente para HuIL-10.

20 Diseño de mutantes puntuales de rhcmvIL-10 defectuosos en la unión a IL-10R1

La secuencia y el análisis estructural de rhcmvIL-10 se usaron para ayudar en el diseño de los mutantes puntuales de rhcmvIL-10 que no pueden unirse a la cadena de IL-10R1 (Figura 2). Las secuencias maduras de HuIL-10 y RhIL-10 comparten el 94 % de identidad de secuencia, mientras que las IL-10 virales (rhcmvIL-10 y cmvIL-10) exhiben entre el 26-29 % de identidad entre sí y con las IL-10 celulares. A pesar de la divergencia de las secuencias de aminoácidos, se conservan varios residuos que forman contactos extensos con IL-10R1 en las interfaces de unión HuIL-10/IL-10R1 y cmvIL-10/HuIL-10R1 (Jones y otros, 2002; Josephson y otros, 2001a) en rhcmvIL-10 (Figura 2).

Mediante el uso de la información estructural descrita en la presente descripción (Figura 2), se identificaron 3 residuos de rhcmvIL-10 (Gln-38, Glu-142, y Asp-144, basado en la numeración de IL-10 de humano) que se esperaba que alteraran al máximo las interacciones de rhcmvIL-10/RhIL-10R1 y previnieran o disminuyeran la actividad biológica de rhcmvIL-10. Estos residuos se eligieron basado en los criterios siguientes. 1) Los residuos se conservaron entre las secuencias de aminoácidos de IL-10 de humano y viral, 2) los aminoácidos hicieron contactos extensos con IL-10R1 en el complejo HuIL-10/HuIL-10R1, y 3) los residuos se ubicaron en el centro de la interfaz HuIL-10/HuIL-10R1. Este criterio final (#3) se requirió debido a que las mutaciones de rhcmvIL-10 esperadas que alteraran la unión de IL-10R1, pero ubicadas en el borde de la interfaz de IL-10/IL-10R1, pudieran cambiar las conformaciones de la cadena lateral para mantener la unión eficiente a IL-10R1. Para probar esta hipótesis, se construyó el mutante Lys-34Glu, que tiene interacciones de puentes de sal con los residuos Asp-100 y Glu-101 de IL-10R1 en el borde de la interfaz IL-10/IL-10R1 (Figura 2B).

40 Caracterización de la unión del mutante de rhcmvIL-10 a IL-10R1

Basado en el análisis anterior, cinco mutantes puntuales de rhcmvIL-10 (Gln-38Arg, Gln-38Tyr, Arg-34Glu, Glu-142Tyr, Asp-144His) se expresaron en células de insecto, y los sobrenadantes se probaron para determinar la unión a la cadena de HuIL-10R1 (Figura 3). Para ayudar en la purificación, y proporcionar un epítipo común para detectar los mutantes de RhCMVIL-10, una etiqueta de 6 residuos de histidina (H6) y un sitio proteasa factor Xa (Fxa) se añadieron a los N-terminales de estos mutantes de rhcmvIL-10 (H6FXa-rhcmvIL-10). El análisis de la transferencia Western reveló que los mutantes H6FXa Gln-38Tyr y Glu-142Tyr de rhcmvIL-10 no se expresaron suficientemente (Figura 3). Los otros 3 mutantes de rhcmvIL-10 (Arg-34Glu, Gln-38Arg, y Asp-144His) se expresaron a niveles comparables, pero fueron incapaces de unirse a las perlas acopladas a HuIL-10R1 (Figura 3).

50 Análisis de mutantes de rhcmvIL-10 en ensayos de proliferación de células TF-1

Para caracterizar los mutantes puntuales de rhcmvIL-10 (Gln-38Arg, Arg-34Glu, y Asp-144His) en un ensayo más sensible, se probó la capacidad de cada mutante para proliferar células TF-1, transfectadas con la cadena humana de IL-10R1 (TF-1/HuIL-10R1) (Liu y otros, 1997). La concentración de rhcmvIL-10, y los mutantes puntuales de rhcmvIL-10, en sobrenadantes de células de *Drosophila* se estimó por SDS-PAGE. Se añadieron diluciones seriadas de cada proteína rhcmvIL-10 y HuIL-10 a células TF-1/HuIL-10R1 y se midió la proliferación después de 2 días. Como se muestra en la Figura 4, rhcmvIL-10 y HuIL-10 exhiben una actividad biológica esencialmente equivalente en el ensayo. Además, rhcmvIL-10 Arg-34Glu, presumiblemente debido su ubicación en el borde de la interfaz IL-10/IL-10R1 (Figura 2), también exhibe esencialmente actividad biológica silvestre. En contraste, rhcmvIL-10 Gln-38Arg y rhcmvIL-10 Asp-144His exhibieron reducciones de ~100 y ~300 veces en actividad en comparación con rhcmvIL-10 y HuIL-10 (Figura 4).

Se probaron dos mutantes dobles de rhcmvIL-10 en el ensayo de células TF-1/HuIL-10R1 (Figura 4B). El mutante 1 rhcmvIL-10 (M1) que contiene las mutaciones puntuales Gln-38Arg y Asp-144His y el mutante 2 rhcmvIL-10 (M2) que contiene las mutaciones Glu-142Gln y Asp-144His. Debido a la poca solubilidad de las proteínas H6FxrhcmvIL-10 durante los estudios de purificación inicial, una etiqueta C-terminal de Fxa y H6 (rhcmvIL-10-FXaH6) se añadió a rhcmvIL-

10 M1 y M2. Se añadieron a las células TF-1/HuIL-10R1 diluciones seriadas de M1 y M2, basadas en las concentraciones de proteína estimadas a partir de los geles SDS-PAGE, que revelaron que rhcmvIL-10M1 y M2 no exhibieron actividad biológica a concentraciones tan altas como ~1 µg/mL (Figura 4B).

5 Análisis de la capacidad de los mutantes de rhcmvIL-10 para suprimir IL-12

Basado en los resultados de los ensayos en TF-1/HuIL-10R1, se purificaron por cromatografía de afinidad de níquel los mutantes dobles de rhcmvIL-10, M1 y M2. Las proteínas purificadas M1 y M2 se evaluaron para determinar su capacidad de inhibir la producción de IL-12 en Rh PMBC estimuladas con lipopolisacárido (LPS) (Figura 5). Cinco concentraciones de rhcmvIL-10 M1 y M2, desde 0,1 ng/mL a 1 µg/mL, se probaron en el ensayo. La comparación de los niveles de IL-12 en cultivos de PBMC tratados con LPS, LPS + M1, o LPS +M2 reveló que los mutantes dobles de rhcmvIL-10 son del ~88-100 % inactivos en el ensayo (Figura 5).

15 Inmunización de macacos rhesus con rhcmvIL-10M1 y rhcmvIL-10M2

Basado en los resultados de los ensayos basados en células, rhcmvIL-10 M1 y M2 se usaron para inmunizar siete macacos Rhesus seropositivos a RhCMV mediante el uso del programa descrito en la Tabla 4. La producción de Ab neutralizantes (NAb) de rhcmvIL-10, durante el procedimiento de inmunización, se monitoreó al probar la capacidad del plasma de animales inmunizados para bloquear la inhibición de IL-12 mediada por rhcmvIL-10 en PBMC estimulados con LPS (Figura 6). Mediante el uso de este ensayo, la presencia de NAb se evaluó 1 día antes a la inmunización inicial con ADN, después de la tercera vacunación (Vx) con ADN, y seis veces después de los refuerzos con proteína (Figura 6). Se generaron niveles aumentados de NAb en 5 de 6 animales que recibieron refuerzos de proteína. Dos de los siete animales ya tenían títulos de NAb (animales 35646 y 35735) que se incrementaron, al menos transientemente, por las vacunaciones con proteína. No se observó aumento en NAb para un animal que recibió la estrategia de inmunización (animal 35735) y un animal control que recibió sólo vacunación con ADN (animal 35779). Ambos animales que no respondieron, 35735 y 35779, se vacunaron con la proteína M2. A pesar de esta observación, M1 y M2 inducen NAb en otros animales. Por lo tanto, mientras que M2 puede considerarse un inmunógeno más débil, los datos indican que la estrategia de vacunación y el estado inmunológico de un animal son los principales contribuyentes a alcanzar respuestas robustas de NAb a rhcmvIL-10.

30 Referencias para el Ejemplo 1

1. Blackburn y Wherry (2007) IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol* 15:143-146
2. Chang y otros. (2004) Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J Virol* 78:8720-8731
3. de Waal Malefyt y otros. (1991a) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220
4. de Waal Malefyt y otros. (1991b) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174:915-924
5. Jones y otros. (2002) Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9404-9409
6. Josephson y otros. (2002) Non-competitive antibody neutralization of IL-10 revealed by protein engineering and X-ray crystallography. *Structure* 10:981-987
7. Josephson y otros. (2001a). Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity* 15:35-46
8. Josephson y otros. (2001b) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of a complex between IL-10 and soluble IL-10R1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1908-1911
9. Kotenko y otros. (2000) Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1695-1700
10. Liu y otros. (1997) The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* 158:604-613
11. Lockridge y otros. (2000) Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virology* 268:272-280
12. Moore y otros. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765
13. Rigopoulou y otros. (2005) Blocking of interleukin-10 receptor--a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. *Clin Immunol* 117:57-64
14. Spencer y otros. (2002) Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76:1285-1292
15. Walter y Nagabhushan (1995) Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold. *Biochemistry* 34:12118-12125
16. Windsor y otros. (1993) Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry* 32:8807-8815
17. Yoon y otros. (2006) Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem* 281:35088-35096
18. Zdanov y otros. (1995) Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* 3:591-601

Ejemplo 2. Inmunogenicidad de Interleucina-10 Viral en Macacos Rhesus Infectados con Citomegalovirus de Rhesus

Resumen

El citomegalovirus humano (HCMV) codifica una proteína viral de interleucina-10 (cmvIL-10) con actividad inmunitaria moduladora comparable a aquella de la interleucina-10 celular. Se conoce poco sobre las respuestas inmunitarias del huésped infectado con cmvIL-10 y si tales respuestas inmunitarias ofrecen un paradigma para la vacunación contra cmvIL-10 y otras proteínas virales moduladoras inmunitarias. En este estudio de macacos rhesus infectados con citomegalovirus rhesus (RhCMV), se usó un formato basado en ELISA para determinar el título y la avidéz de los anticuerpos a la proteína rhIL-10 de CMV (rhcmvIL-10), y los títulos de anticuerpos neutralizantes se cuantificaron por inhibición de la actividad funcional de rhcmvIL-10 en un bioensayo de células linfoides activadas. Los resultados demuestran que rhcmvIL-10 es generalmente un inmunógeno fuerte durante la infección primaria, que estimula títulos altos en plasma de anticuerpos neutralizantes con alta avidéz que persisten durante la vida del huésped. Sin embargo, los resultados además sugieren que el título de anticuerpos para rhcmvIL-10 en animales infectados a largo plazo puede ser insuficiente para neutralizar función de rhcmvIL-10 en las superficies mucosas y en los tejidos subyacentes. Extrapolando estos resultados, la ausencia de títulos neutralizantes protectores en los tejidos mucosos puede contribuir a la modulación inmunitaria mediada por cmvIL-10 de HCMV, que facilita su capacidad para reinfectar huéspedes con previa inmunidad. La inmunización contra cmvIL-10 representa una estrategia potencial para mejorar la manipulación del virus del ambiente microinmune de las células infectadas durante la infección primaria y secundaria en una superficie de la mucosa.

El citomegalovirus humano, un miembro de la subfamilia Betaherpesviridae del Orden Herpesvirales (17), infecta al 50 - 100 % de los adultos en todo el mundo (4). La infección primaria en individuos inmunocompetentes es generalmente subclínica, aunque se observan resultados clínicamente evidentes, tal como un síndrome parecido a la mononucleosis, en una minoría de infecciones (2). En todos los casos, la infección primaria en un individuo inmunocompetente es seguida por una persistencia viral de por vida en la que las células infectadas de manera latente periódicamente se reactivan para producir viriones infecciosos en ausencia de signos clínicos de enfermedad (8). Mientras que ambas etapas de infección por HCMV la primaria y la persistente son en su mayoría asintomáticas en individuos inmunocompetentes, la replicación no restringida de HCMV es una causa de morbilidad y mortalidad en individuos inmunocomprometidos, tales como pacientes infectados con VIH, receptor de trasplantes de órganos sólidos o médula ósea inmunodeprimidos, y fetos/recién nacidos infectados transplacentalmente. El HCMV se ha reconocido durante mucho tiempo como una amenaza infecciosa significativa para el desarrollo fetal, que algunas veces se manifiesta como deficiencias neurológicas de por vida y pérdida de la audición neurosensorial en fetos/neonatos infectados congénitamente (21, 52). Los esfuerzos para desarrollar una vacuna que confiera eficacia protectora contra la transmisión congénita de HCMV ha estado en curso durante más de tres décadas (19, 21, 39, 49, 55). Se ha hecho avances recientes mediante el uso de glicoproteína B (gB) recombinante formulada en el adyuvante MF59, que logró el 50 % de eficacia protectora contra la seroconversión en mujeres embarazadas seronegativas (37). La ausencia de protección completa con gB recombinante solo implica que la inclusión de antígenos virales adicionales podría aumentar el nivel de la eficacia protectora. Una clase de antígenos que no se ha examinado consiste en aquellas proteínas virales que modulan las respuestas inmunitarias del huésped.

In vitro y los datos comparativos de secuencia sugieren que la persistencia de HCMV se facilita por la expresión de múltiples proteínas moduladoras inmunitarias, codificadas viralmente, que dificultan el desarrollo de respuestas inmunitarias suficientes para eliminar los reservorios virales de largo plazo. La subversión del sistema inmunitario para permitir tanto la eliminación desde el sitio primario de infección como el mantenimiento de una infección persistente se atribuye generalmente a la capacidad de virus para alterar la señalización celular, activación, tráfico, y apoptosis (33, 35, 43). Una porción sustancial del genoma de HCMV es para las proteínas virales inmunomoduladoras. Aproximadamente el 70 % del genoma total de HCMV puede eliminarse sin alterar la replicación viral en fibroblastos, lo que deja la mayoría del genoma dedicado a codificar las proteínas que modifican el microambiente de la célula infectada o que se requieren para tropismos a células específicas (18, 56). La investigación sobre moduladores inmunitarios virales se ha centrado primariamente en su interacción con y alteración del sistema inmunitario, lo que deja la inmunogenicidad de estas proteínas esencialmente sin explorar. La considerable dedicación de la capacidad codificante viral a proteínas inmunomoduladoras implica que desempeñan funciones vitales en la replicación y eliminación de HCMV *in vivo*.

En consecuencia, las respuestas inmunitarias mediadas por vacunas dirigidas hacia esta clase de proteínas virales pudieran afectar significativamente los parámetros de crecimiento de HCMV seguido de las exposiciones virales. La proteína viral de interleucina-10 codificada por el marco abierto de lectura HCMV UL111a (cmvIL-10) se secreta de las células infectadas y altera la funcionalidad de múltiples células efectoras inmunitarias (12-14, 23, 24, 26, 28, 31, 43, 47, 48). Como una primera etapa hacia evaluar si la vacunación contra cmvIL-10 pudiera conferir una medida de la eficacia protectora inmunitaria, se analizaron respuestas humores contra esta proteína viral en macacos rhesus para investigar la ontogenia y la relevancia biológica de las respuestas de anticuerpos contra rhcmvIL-10 después de la inoculación experimental o infección natural con RhCMV.

Expresión y purificación de rhcmvIL-10

Las enzimas de restricción se adquirieron de New England Biolabs. El sitio de SacII endógeno en la secuencia que codifica RhCMV IL-10 (Núm. de Acceso a la Base de Datos Genbank® 59907) se eliminó por introducción de una mutación silenciosa

mediante el uso del kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange (Stratagene) con el cebador: 5'-GCACGGCAAAAGCAGCGGCCGAGGCTG-3' y su complemento inverso. El ADNc resultante se amplificó por PCR mediante el uso de polimerasa Pfu Turbo (Stratagene) con el cebador directo: 5'-GCTCAGCCGCGGCCCATGACCATGAACACAAAGAAG-3' y el cebador inverso: 5'-CGTATCACCGGTGCGGCCCTCGATGCTGAACTGCAGCAGCAGCAGGAACGTTTCC-3'. El cebador de 3' codificó unos 13 residuos de aminoácidos adicionales (SIEGRTGHHHHH-parada) el C-terminal de la proteína. El producto del PCR se digirió con SacII y AgeI seguido por el ligamiento en el vector de expresión pMT/V5-hisA (Invitrogen) que contiene un péptido señal heterólogo para generar *pMTA/rhcmvIL-10FXH*. rhcmvIL-10 se expresó en células de *Drosophila* mediante transfección por fosfato de calcio de *pMTA/rhcmvIL-10FXH* como se describe por el fabricante (Invitrogen). rhcmvIL-10 secretada al medio se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel.

ELISA de rhcmvIL-10

Los anticuerpos contra rhcmvIL-10 se caracterizaron mediante ELISA por modificación de un protocolo previamente publicado (58). En resumen, microplacas de 96 pocillos (Immulon 4 HBX, Dynex Technologies Inc.) se cubrieron toda la noche a 4 °C con rhcmvIL-10 purificado por afinidad a níquel (12,5 ng/pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma)/0,375 % de bicarbonato de sodio (GIBCO). Cada placa se lavó subsecuentemente 6 veces con PBS/0,05 % Tween 20 (Sigma) (PBS-T) y se bloqueó con 300 µl/pocillo de PBS/1 % de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) durante 2 horas a 25 °C en una incubadora con temperatura controlada. Después del lavado de las placas 6 veces con PBS-T, se añadió 100 µl de una dilución 1:100 de plasma de mono rhesus (en PBS-T/1 % de BSA) a cada pocillo y se incubó a 25 °C durante 2 horas. Las muestras de plasma fueron de macacos rhesus confirmados serológicamente estar infectados o no con RhCMV. Cada muestra se evaluó por triplicado. Las placas se lavaron subsecuentemente 6 veces con tampón de lavado PBS-T y se cargaron con 100 µl/pocillo de una dilución 1:60 000 de IgG de cabra-anti-mono conjugada a peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc - KPL) y se incubaron a 25 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron después 6 veces con tampón de lavado PBS-T y se añadió 100 µl/pocillo de sustrato de tetrametilbenzidina líquido (TMB) (Sigma) y se incubaron durante 30 min a 25 °C. El desarrollo del color de TMB se detuvo por la adición de 50 µl/pocillo de 0,5 M de ácido sulfúrico. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, desarrollo del color se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas Modelo 680 (BioRad). Las unidades relativas (UR) se cuantificaron mediante el uso de una curva estándar de diluciones seriadas de 10 veces del plasma de un macaco rhesus inmunizado con rhcmvIL-10. El umbral para que una muestra se considere positiva para una respuesta de anticuerpos específicos para rhcmvIL-10 (UR = 1) se estableció en 6 desviaciones estándar por encima de la densidad óptica media del control seronegativo derivada de 30 muestras seronegativas.

Detección por transferencia Western de rhcmvIL-10

Las respuestas de anticuerpos contra la proteína rhcmvIL-10 se analizaron por electroforesis en gel SDS-PAGE y transferencia Western. La proteína rhcmvIL-10 (2,5 µg) se sometió a electroforesis en un gel de acrilamida al 12 % desnaturante (Bio-Rad) y se transfirió a polifluoruro de vinilo (PVDF) (50). La membrana se bloqueó toda la noche en 5 % de leche/ PBS/ 0,1 % Tween 20 con agitación a temperatura ambiente. Tiras individuales de la membrana se incubaron después durante 2 horas a temperatura ambiente con 1 ml de plasma de macaco rhesus diluido en 1:100 en 5 % de leche/PBS/0,1 % Tween 20. Las tiras se lavaron después tres veces (5 minutos por lavado) con PBS/0,1 % Tween 20 y se incubaron después con 2 ml de un IgG anti-mono conjugado a peroxidasa (KPL) (diluido 1:5000 en 5 % de leche/PBS/0,1 % Tween 20) a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana se lavó de nuevo, y anticuerpo que se unió se detectó mediante el uso del Kit de Detección ECL Plus Western Blot (GE Healthcare). La fluorescencia se detectó mediante el uso del generador de imágenes de modo variable Typhoon 9410 (GE Healthcare), e intensidad de la banda se cuantificó con el software Image Quant (GE Healthcare). Adicionalmente, la serorreactividad contra rhcmvIL-10 se detectó por transferencia Western mediante el uso de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories) como un reactivo de detección colorimétrico. En este caso, la concentración de proteína rhcmvIL-10 se aumentó a 5 µg, el tiempo de incubación primaria se aumentó a una incubación de toda la noche, y el anticuerpo secundario (IgG anti-mono conjugado a peroxidasa) se usó a una concentración de 1:200. Después del último lavado (PBS/0,1 % Tween), la membrana se incubó a temperatura ambiente con DAB hasta que las bandas se hicieron claramente visibles.

Ensayo de avidéz de los anticuerpos contra rhcmvIL-10

La unión por avidéz de anticuerpos contra rhcmvIL-10 se evaluó de manera similar al protocolo de ELISA, excepto que después de la incubación primaria de 2 horas con el plasma diluido, los pocillos se incubaron en 6M de urea recién preparada durante cinco minutos a temperatura ambiente, y se lavaron después extensamente con PBS-T. El anticuerpo secundario de cabra anti-mono se añadió después durante 1 hora, y las placas se lavaron y procesaron para el desarrollo colorimétrico de acuerdo con el protocolo de ELISA. El Índice de Avidéz (AI) se calculó al dividir la densidad óptica media de una muestra tratada con 6M de urea por la densidad óptica media de la muestra no tratada con 6M de urea.

Neutralización de la función de rhcmvIL-10 *in vitro*

Las muestras de plasma de macacos RhCMV seropositivos y seronegativos se diluyeron (1:4000) en RPMI/10 % de suero fetal bovino (600 µL volumen final) en presencia o ausencia de rhcmvIL-10 recombinante (0,5 ng/mL) durante 3 horas a 37 °C. Esta dilución del plasma fue necesaria debido a la presencia en el plasma de factores inhibidores endógenos en el

plasma menos diluido que inhibieron la producción de IL-12 por las PBMC activadas. Mezclas de 200 µL del plasma +/- rhcmvIL-10 se incubaron después (cada una por duplicado) con 4×10^5 PBMC purificados por Ficoll/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Falcon) durante 30 minutos en una incubadora humedecida a 37 °C (5 % de CO₂). LPS (de *E. coli* O127:B8; Sigma) se añadió después a las células (5 µg/mL concentración final), y las células se incubaron después 24 horas a 37 °C (5 % de CO₂). El sobrenadante se colectó el día siguiente y se almacenó a -80 °C hasta ensayarse para la producción de IL-12. La secreción de IL-12 por los PBMC activados con LPS se midió por ELISA (U-Cytech, Holanda), de acuerdo con el protocolo del fabricante con ligeras variaciones. En resumen, las microplacas de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) se cubrieron con el par de anticuerpos IL-12 suministrados (p40 + p70) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron después 6 veces con PBS-T y se incubaron con tampón de bloqueo PBS/1 % BSA durante 60 minutos a 37 °C. El tampón se eliminó, se añadió 100 µL/pocillo de sobrenadante de PBMC, y la mezcla de células se incubó a 4 °C toda la noche. Las placas se lavaron después 6 veces con tampón de lavado PBS-T, se añadió 100 µL/pocillo de anticuerpo anti-mono detector de ELISA, y las células se incubaron 1 hr a 37 °C. Después del lavado, se añadió 100 µL/pocillo de polímero de estreptavidina-HR (SPP) conjugado (U-Cytech) y se incubaron a 37 °C durante 1 hr. Después del lavado, se añadió el sustrato TMB (100 µL/pocillo), y las placas se incubaron a 25 °C durante 11 min. El desarrollo del color se detuvo por la adición de 0,5 M de ácido sulfúrico (50 µL/pocillo). Luego de una incubación de 5 minutos (25 °C), las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas Modelo 680 (BioRad). Las concentraciones de IL-12 se cuantificaron mediante el uso de un estándar de IL-12 recombinante diluido en serie 2 veces (U-Cytech) que se incluyó en cada placa. La neutralización se calculó como el inverso de la relación de (concentración de IL-12 + rhcmvIL-10 + plasma)/(concentración de IL-12 + plasma solo) y se expresó como el "por ciento de restauración de la inducción de IL-12."

Estadística

Todos los resultados de DO basados en ELISA se convirtieron en unidades relativas de IgG mediante el uso de una ecuación de modelo de regresión log-log. Se usó el programa de análisis estadístico Prism 4 para todos los análisis estadísticos. Todas las muestras de corral para detectar la presencia de RhCMV y anticuerpos contra rhcmvIL-10 se analizaron mediante el uso de la prueba t de Student ($\alpha=0,05$). Todas las correlaciones significativas se determinaron mediante el uso de análisis del coeficiente de correlación de Pearson. Se usaron ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$) para todos los análisis por edades.

Serovigilancia de anticuerpos rhcmvIL-10 en Monos infectados con RhCMV

Un ELISA de rhcmvIL-10 se desarrolló para caracterizar la cinética y magnitud de los anticuerpos específicos contra rhcmvIL-10 en macacos infectados con RhCMV. Se realizaron ensayos pilotos para optimizar la cantidad de antígeno de recubrimiento y la concentración de anticuerpo secundario necesario para proporcionar un intervalo lineal amplio de reactividad y maximizar la distinción entre las muestras de plasma de animales infectados con RhCMV y no infectados. Basado en estos ensayos, los pocillos se cubrieron con 12,5 ng/pocillo de rhcmvIL-10 recombinante, y una dilución 1:60 000 de IgG de cabra anti-mono se usó como la concentración de anticuerpo secundario. Las muestras de plasma de macacos rhesus alojados al aire libre, que fueron confirmados como seropositivos o seronegativos a RhCMV por un ELISA mediante el uso de extracto de células infectadas con RhCMV como antígeno (53 positivos a RhCMV y 35 negativos a RhCMV) (58), se eligieron al azar y se tamizaron por ELISA para detectar la presencia de anticuerpos contra rhcmvIL-10. Todos los macacos positivos a anticuerpos contra RhCMV fueron positivos para anticuerpos de unión a rhcmvIL-10, mientras que todas las muestras negativas a anticuerpos contra RhCMV fueron también negativas para anticuerpos contra rhcmvIL-10 ($p<0,0001$) (Figura 7). Los títulos de anticuerpo de unión a rhcmvIL-10 en la población positiva a anticuerpos contra RhCMV variaron de 3 - 24 unidades relativas (UR, descritas en la presente descripción) con una mediana de 11,9 UR.

Para verificar la especificidad del ELISA de rhcmvIL-10, muestras de plasma de 16 animales seropositivos a RhCMV y 4 seronegativos a RhCMV que se tamizaron por el ELISA de rhcmvIL-10 se eligieron al azar y se evaluaron por transferencia Western mediante el uso de la misma rhcmvIL-10 recombinante como el antígeno. Todos los animales seropositivos a RhCMV excepto dos (#8 y 9) tuvieron niveles detectables de reactividad fluorescente en la transferencia Western a una proteína de ~20 kDa, consistente con el tamaño predicho, mientras que no se detectó reactividad inmunitaria en los macacos seronegativos a RhCMV (#17 - 20) (eje Y izquierdo, Figura 8A). El análisis cuantitativo de la reactividad de la transferencia Western generalmente confirmó los títulos relativos del ELISA (eje Y derecho, Figura 8A), aunque se observaron algunas pequeñas discrepancias. No hubo reactividad detectable en la transferencia Western para los animales #8 y 9, mientras que los títulos de ELISA para rhcmvIL-10 para ambos (8 y 11 UR, respectivamente) fueron comparables a los animales agrupados por edad. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad de la transferencia Western mediante el uso de DAB como el reactivo de detección colorimétrico, permitió la detección de unas bandas reactivas a 20 kDa en todas las muestras positivas a RhCMV (Figura 8B), que incluyen los monos #8 y 9.

Cuando los títulos de anticuerpos contra rhcmvIL-10 se estratificaron por la edad del animal, (≤ 1 , 5 - 10, y >13 años, correspondientes a infantes, adultos, y animales ancianos, respectivamente), se detectaron títulos específicos de rhcmvIL-10 significativamente mayores en los infantes, en comparación con los grupos de adultos y ancianos ($p<0,001$, $p<0,01$ respectivamente) (Figura 9A). Los títulos de rhcmvIL-10 en los animales adultos y ancianos fueron indistinguibles. Los estudios seroepidemiológicos previos han demostrado que los macacos al aire libre, alojados en grupo, similares a los incluidos en este estudio, existe un 50 % de seroconversión a la infección por RhCMV a los 6 meses de edad y la

seroconversión completa a alrededor de 1 año (50). Por lo tanto, lo más probable es que los animales adultos y ancianos se hayan infectado a largo plazo (>4 - >12 años) con RhCMV. El aumento relativo de las respuestas de anticuerpos contra vIL-10 en los juveniles no parece ser específico a esta proteína viral particular. Se observó un patrón similar relacionado con la edad de serorreactividad cuando se usó en su lugar una preparación de antígeno, que consiste en un lisado de proteína total de células infectadas con RhCMV. Hubo una fuerte correlación entre los títulos de anticuerpos contra rhcmvIL-10 y los títulos de anticuerpos contra RhCMV (Pearson, $r = 0,6176$, $P < 0,0001$) (Figura 9B), lo que indica que la magnitud de títulos de anticuerpos contra rhcmvIL-10 reflejó la magnitud de los títulos de anticuerpos contra los antígenos totales de RhCMV.

10 Cinética *de novo* de anticuerpos contra rhcmvIL-10 después de la infección por RhCMV

La detección de anticuerpos IgG antivirales en una infección experimental por RhCMV generalmente ocurre de dos a tres semanas después de la inoculación (1, 30, 57). Para determinar la cinética temporal del desarrollo de anticuerpos específicos contra rhcmvIL-10 en relación con los anticuerpos de unión a RhCMV, 6 animales, experimentalmente inoculados con 5×10^4 unidades formadores de placas de la variante 68-1 de RhCMV por una combinación de inyección intravenosa y subcutánea, se analizaron prospectivamente por ELISA para determinar el desarrollo de anticuerpos IgG de unión a RhCMV y de unión a rhcmvIL-10. Cuatro animales exhibieron anticuerpos detectables contra rhcmvIL-10 (>2 UR) 2 - 3 semanas después de la inoculación mientras que los restantes dos animales se volvieron serorreactivos a rhcmvIL-10 a 6 - 7 semanas después de la inoculación. La detección del anticuerpo contra rhcmvIL-10 coincidió aproximadamente con el desarrollo de la respuesta de anticuerpos contra RhCMV total. Subsecuente a la respuesta positiva inicial, los niveles de anticuerpo contra rhcmvIL-10 aumentaron a 14 - 16 UR en 4 de los 6 animales y aumentaron solo a ~4 - 5 UR en los restantes dos animales al cesar el estudio a las 10 semanas (Figura 10).

25 Aidez de los anticuerpos contra rhcmvIL-10

La fuerza de unión de los anticuerpos se evaluó para 50 macacos positivos a RhCMV mediante el uso de un ensayo de avides ELISA con un lavado con 6M de urea. Todos los animales tuvieron un índice de avides relativamente alto, que varió de 0,63 a 0,96 con un promedio de 0,83 (desviación estándar = 0,076) (Figura 11). Estos resultados fueron consistentes con lo que se ha encontrado anteriormente sobre la avides global del anticuerpo contra RhCMV (30). No se detectaron diferencias en la avides entre los grupos de edad.

Títulos neutralizantes de anticuerpos contra rhcmvIL-10

Las respuestas de anticuerpos neutralizantes se detectaron por un ensayo *in vitro* en el que muestras de plasma de animales inmunes a RhCMV se evaluaron para detectar la capacidad para neutralizar respuestas mediadas por rhcmvIL-10 en células mononucleares de sangre periférica activadas (PBMC). En resumen, el ensayo comparó el nivel de IL-12 sintetizado por PBMC activados por lipopolisacárido (LPS) después de la incubación con rhcmvIL-10 diluido en plasma de rhesus o plasma solo. Los ensayos preliminares verificaron que las PBMC estimuladas con LPS secretaron altas cantidades de IL-12 (un promedio de $1,5 \text{ ng}/2 \times 10^5$ células), lo cual se anuló cuando las células se pretrataron con rhcmvIL-10. Dado que rhcmvIL-10 inhibe la producción de IL-12 en PBMC tratadas con LPS, la neutralización mediada por anticuerpo pudiera medirse por los niveles de producción mayores de IL-12 después de la incubación de PBMC activadas con LPS con rhcmvIL-10. Si una muestra de plasma no tuviera anticuerpos neutralizantes de rhcmvIL-10, la expresión de IL-12 no se restauraría. Basado en estos resultados, la inducción de IL-12 se usó para cuantificar la capacidad de los anticuerpos contra rhcmvIL-10 de unirse y neutralizar la actividad de rhcmvIL-10. Las muestras de plasma de 26 macacos rhesus seropositivos y 9 seronegativos se seleccionaron del grupo de los previamente ensayados por el ELISA de unión a vIL-10 y se evaluaron para detectar la capacidad de neutralizar la actividad de rhcmvIL-10. Los animales seropositivos a RhCMV exhibieron un amplio intervalo de actividad neutralizante (0 - 100 % de inducción de IL-12 restaurada) con una mediana de 15,9 % de inducción de IL-12 restaurada (Figura 12A). No se detectó neutralización de rhcmvIL-10 mediante el uso del plasma de monos no infectados con RhCMV. Los títulos de neutralización de rhcmvIL-10 exhibieron una correlación positiva con los títulos de anticuerpo contra rhcmvIL-10 (Figura 12B; $r = 0,8292$, $p < 0,0001$). Los juveniles mostraron títulos de neutralización ligeramente mayores de rhcmvIL-10 que los adultos, consistente con los títulos mayores de anticuerpo contra rhcmvIL-10 observados en este grupo de edad (Figura 9B).

La proteína IL-10 de HCMV altera la funcionalidad *in vitro* de múltiples tipos celulares comparables al fenotipo de cIL-10, a pesar de la considerable divergencia de secuencia entre las dos proteínas (28, 31). La exposición de las células cultivadas a cmvIL-10 reduce: (i) la proliferación de PBMC estimuladas con mitógeno y la síntesis de la producción de citocinas proinflamatorias en PBMC y monocitos activados (48); (ii) la maduración, y expresión de citocinas proinflamatorias y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC) (14, 40); (iii) la supervivencia celular de MoDC activadas (13); (iv) la activación de genes de IFN- α/β en células dendríticas plasmacitoides (12); y (v) la migración e invasión de células endoteliales y citotrofoblastos (54). Además, cmvIL-10 estimula la proliferación de células B (47) y aumenta la expresión de cIL-10 (14). Basado en las propiedades funcionales demostradas de rhcmvIL-10 *in vitro*, es probable que este modulador inmunitario de HCMV manifieste efectos pleiotrópicos *in vivo* en las células efectoras inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Por lo tanto, es razonable considerar que la neutralización de la función de cmvIL-10 a través de la vacunación pudiera aumentar el nivel de la eficacia protectora generado con otros antígenos virales, tal como gB.

Este estudio demuestra que la infección por RhCMV estimula el desarrollo de anticuerpo específicos para rhcmvIL-10 de alta avidez en todos los animales infectados. Existe un amplio intervalo en los títulos de anticuerpos contra rhcmvIL-10 entre los monos, y debido a que los títulos de anticuerpos neutralizantes se correlacionan fuertemente con títulos de anticuerpos de unión rhcmvIL-10, existe un correspondiente amplio intervalo de títulos que neutralizan la función de rhcmvIL-10 *in vitro*. El nivel mediano de la neutralización de rhcmvIL-10 medido en el ensayo basado en IL-12 es del 16 %, lo que sugiere que la mayoría de los animales infectados no desarrollan títulos de anticuerpos acordes con el bloqueo efectivo del ligando rhcmvIL-10 con su receptor de IL-10 celular. Una consideración importante de esta interpretación es si los resultados *in vitro* son relevantes en el contexto de las interacciones virus-huésped *in vivo*. Un estudio previo de este laboratorio que caracteriza los efectos inmunosupresores de la cmvIL-10 en MoDC mostró que la concentración de cmvIL-10 secretado por las células infectadas con HCMV estaba en el intervalo de 0,8 - 4 ng/ml (14). Basado en este hallazgo, la concentración de rhcmvIL-10 usada para el ensayo de neutralización en este informe (0,5 ng/ml) es virológicamente apropiada.

Las muestras de plasma se diluyeron 1:4000 para el ensayo de neutralización, y los resultados indican que la proteína rhcmvIL-10 en sangre pudiera tener de poca a ninguna función biológica en huéspedes infectados a largo plazo. Dado que está bien documentado que HCMV puede transmitirse a través de una superficie de la mucosa y reinfectar un huésped con previa seroinmunidad (5, 6, 16, 36, 42, 53), la contribución potencial de los anticuerpos específicos para rhcmvIL-10 a la inmunidad protectora sería primariamente una función del título local en las superficies de la mucosa a través de la cual se puede transmitir el HCMV. La concentración de IgG en fluidos de las mucosas, tal como saliva, es $\leq 0,1$ % del encontrado en plasma (3, 7, 10, 41, 51). En consecuencia, la dilución de plasma usada para los ensayos de neutralización es una aproximación razonable de los títulos de anticuerpo anti-rhcmvIL-10 que pudieran encontrarse en los tejidos subyacentes a las superficies mucosas en individuos seroinmunes.

Tomados en conjunto, los resultados en este estudio indican que los anticuerpos contra rhcmvIL-10 en la gran mayoría de los monos inmunes no contribuirían significativamente a la neutralización efectiva de la función de rhcmvIL-10 en el microambiente de células infectadas en una superficie de la mucosa. Basado en la extremadamente alta afinidad de cmvIL-10 por el receptor de IL-10 de humano (27), es posible que no sean necesarias muchas moléculas de rhcmvIL-10 para iniciar las cascadas de señalización mediadas por el receptor de IL-10. Una importante implicación de la ausencia de títulos neutralizantes robustos dentro de la mucosa es que un virus reinfectante pudiera ser capaz de suprimir las respuestas inmunitarias innatas y de memoria a través de rhcmvIL-10, lo que permite potencialmente la eliminación sistémica de una infección no primaria más allá del sitio de infección dentro de un huésped inmune.

Los estudios *in vitro* de cmvIL-10 demuestran que suprime de manera similar las funciones efectoras de CD4⁺ en un modelo experimental de latencia y persistencia. La infección de células progenitoras de mieloides purificadas CD34⁺ con una variante de HCMV con cmvIL-10 eliminada aumenta (i) la expresión en la superficie celular de moléculas del MHC clase II en células infectadas, (ii) la proliferación y (iii) la expresión de interferón- γ por células T CD4⁺ cocultivadas autólogas o alogénicas, en comparación con la infección con la variante parental que expresa cmvIL-10 (15). Un tema unificador que vincula el HCMV y los estudios *in vitro* de HCMV es la explotación viral de la atenuación mediada por cIL-10 o cmvIL-10 del aclaramiento inmunitario, respectivamente, y las ventajas potenciales de aumentar la neutralización de cmvIL-10 en las superficies mucosas y sitios de persistencia a largo plazo.

Los estudios *in vitro* que abordan la alteración de las funciones de las células dendríticas plasmacitoides y mieloides por cmvIL-10 conducen a un modelo de manera que cmvIL-10 desempeña un papel destacado en la evasión del sistema inmunitario durante la infección primaria, lo que permite el establecimiento de una infección persistente, y que las subsecuentes reinfecciones sean posibles por lacmvIL-10 actividad supresora en la mucosa. Una vacuna que incluye cmvIL-10 como un antígeno puede prevenir la respuesta inmunitaria alterada durante las infecciones primarias y subsecuentes, lo que permite que el huésped desarrolle mejores respuestas inmunitarias protectoras.

Referencias para el Ejemplo 2

1. Abel y otros. 2008 A heterologous DNA prime/protein boost immunization strategy for rhesus cytomegalovirus. *Vaccine* 26:6013-25
2. Alford y Britt. 1993 Cytomegalovirus, p. 227-255. In B. Roizman, R. J. Whitley, y C. Lopez (ed.), *The Human Herpesviruses* Raven Press, Ltd., New York
3. Bergquist y otros. 1997 Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 65:2676-84
4. Boppana y Fowler 2007 Persistence in the population: epidemiology and transmission, p. 795-813. In A. Arvin, G. Campadelli, P. Moore, E. Mocarski, B. Roizman, R. Whitley, y K. Yamanishi (ed.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis* Cambridge University Press, Cambridge
5. Boppana y otros. 1999 Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 104:55-60
6. Boppana y otros. 2001 Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 344:1366-71
7. Bouvet y otros. 1994 Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination. *Infect Immun* 62:3957-61

8. Britt, W. 2008 Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol*325:417-70
9. Campbell y otros. 2008 The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence. *Med Microbiol Immunol*197:205-13
- 5 10. Cartry y otros. 1997 Quantification of IgA and IgG and specificities of antibodies to viral proteins in parotid saliva at different stages of HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*109:47-53
11. Cavanaugh y otros. 2003 Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland. *J Virol*77:1703-17
12. Chang y otros. 2009 Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog. *Virology*390:330-7
- 10 13. Chang y otros. 2007 Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous or endogenous IL-10 during maturation determines their longevity. *J Immunol*178:7794-804
14. Chang y otros. 2004 Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J Virol*78:8720-31
- 15 15. Cheung y otros. 2009 The role of the human cytomegalovirus UL111A gene in down-regulating CD4+ T-cell recognition of latently infected cells: implications for virus elimination during latency. *Blood*114:4128-37
16. Dar y otros. 2008 Congenital cytomegalovirus infection in a highly seropositive semi-urban population in India. *Pediatr Infect Dis J*27:841-3
17. Davison y otros. 2009 The order Herpesvirales. *Arch Virol*154:171-7
- 20 18. Dunn y otros. 2003 Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA*100:14223-8
19. Elek y Stern. 1974 Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet*1:1-5.
20. Gruber y otros. 2008 Differential signaling of cmvIL-10 through common variants of the IL-10 receptor 1. *Eur J Immunol*38:3365-75.
- 25 21. Hanshaw, J. B. 1971 Congenital cytomegalovirus infection: a fifteen-year perspective. *J Infect Dis*123:555-61
22. Humphreys y otros. 2007 Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J Exp Med*204:1217-25
23. Jaworowski y otros. 2009 Enhanced monocyte Fc phagocytosis by a homologue of interleukin-10 encoded by human cytomegalovirus. *Virology*391:20-4
- 30 24. Jenkins y otros. 2004 A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J Virol*78:1440-7
25. Jenkins y otros. 2008 Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection. *Virology*370:285-94
26. Jenkins y otros. 2008 Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J Virol*82:3736-50
- 35 27. Jones y otros. 2002 Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc Natl Acad Sci USA*99:9404-9
28. Kotenko y otros. 2000 Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci*97:1695-700
- 40 29. Kotenko y otros. 2000 Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci USA*97:1695-700
30. Lockridge y otros. 1999 Pathogenesis of experimental rhesus cytomegalovirus infection. *J Virol*73:9576-9583
31. Lockridge y otros. 2000 Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virology*268:272-80
32. Lu y otros. 2006 Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation contributes to the inability of CD8 T cells to control virus in the salivary gland. *J Virol*80:4200-2
- 45 33. Miller-Kittrell y otros. 2007 Functional characterization of chimpanzee cytomegalovirus chemokine, vCXCL-1(CCMV). *Virology*364:454-65
34. Mitchell y otros. 1996 Murine cytomegalovirus DNA in peripheral blood of latently infected mice is detectable only in monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Virology*223:198-207
- 50 35. Mocarski, E. S., Jr. 2002 Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*10:332-9
36. Mussi-Pinhata y otros. 2009 Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis*49:522-8
37. Pass y otros. 2009 Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*360:1191-9
- 55 38. Pilgrim y otros. 2007 A focused salivary gland infection with attenuated MCMV: an animal model with prevention of pathology associated with systemic MCMV infection. *Exp Mol Pathol*82:269-79
39. Plotkin, S. A. 1994 Vaccines for varicella-zoster virus and cytomegalovirus: recent progress. *Science*265:1383-5
40. Raftery y otros. 2004 Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J Immunol*173:3383-91
- 60 41. Raux y otros. 2000 IgG subclass distribution in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*16:583-94
42. Ross y otros. 2010 Cytomegalovirus reinfections in healthy seroimmune women. *J Infect Dis*201:386-9
43. Slobedman y otros. 2009 Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol*83:9618-29
- 65 44. Slobedman y otros. 2002 Latent cytomegalovirus down-regulates major histocompatibility complex class II expression on myeloid progenitors. *Blood*100:2867-73

45. Soderberg y otros. 1993 Identification of blood mononuclear cells permissive of cytomegalovirus infection in vitro. Transplant Proc25:1416-8
46. Spencer, J. V. 2007 The cytomegalovirus homolog of interleukin-10 requires phosphatidylinositol 3-kinase activity for inhibition of cytokine synthesis in monocytes. J Virol81:2083-6
- 5 47. Spencer y otros. 2008 Stimulation of B lymphocytes by cmvIL-10 but not LAcmvIL-10. Virology314:164-9
48. Spencer y otros.2002 Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus- encoded interleukin-10. J Virol76:1285-92
49. Stratton y otros. 2000Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decision Making, National Academy Press, Washington, DC
- 10 50. Vogel y otros. 1994 Seroepidemiologic studies of cytomegalovirus infection in a breeding population of rhesus macaques. Lab Anim Sci44:25-30
51. Wang y otros. 1996 Mucosal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B occur following both natural infection and immunization with human cytomegalovirus vaccines. J Infect Dis174:387-92
52. Weller, T. H. 1971 The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (second of two parts). NE J Med285:267-274
- 15 53. Yamamoto y otros. 2010 Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. Am J Obstet Gynecol202:297 e1-8
54. Yamamoto-Tabata y otros.2004 Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. J Virol78:2831-40
- 20 55. Yow, M. D. 1989 Congenital cytomegalovirus disease: a new problem. J. Infect. Dis. 159:163-167
56. Yu y otros. 2003 Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. Proc Natl Acad Sci USA100:12396-401
57. Yue y otros. 2007 Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing rhesus cytomegalovirus glycoprotein B, phosphoprotein 65-2, and viral interleukin-10 in rhesus macaques. J Virol81:1095-109
- 25 58. Yue y otros. 2003 Antibody responses to rhesus cytomegalovirus glycoprotein B in naturally infected rhesus macaques. J Gen Virol84:3371-9

Ejemplo 3. Vacunación de sensibilización/refuerzo de macacos rhesus con rhcmvIL-10 inactivo funcionalmente

30 Se introdujeron mutaciones sitio dirigidas en el gen viral para la interleucina-10 (rhcmvIL-10) de citomegalovirus rhesus (RhCMV) mediante el uso de métodos basados en la estructura para crear dos versiones no funcionales de rhcmvIL-10 que (a) no se unirían al receptor celular para rhcmvIL-10 (IL-10R), y (b) no exhibe inmunosupresión en células linfoides de rhesus. Cuatro macacos rhesus que no estaban infectados con RhCMV se inmunizaron genéticamente en la

35 Semana 0 con dos vectores de expresión plasmídicos separados para dos versiones mutadas de rhcmvIL-10 (M1 y M2) seguido por tres inmunizaciones de refuerzo con proteína a las semanas 6, 12, y 26 mediante el uso de 50 µg de cada M1 y M2 purificado adyuvado en Montanide ISA 720. Se colectaron muestras de sangre longitudinales, y se analizaron los anticuerpos anti-rhcmvIL-10 para determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes (NAb). Los animales vacunados se expusieron en la semana 34 con una inoculación subcutánea (S.C.) con 1×10^3 unidades formadoras de placa (PFU) de la cepa UCD59 de RhCMV. Cuatro macacos no inmunizados que no se infectaron con RhCMV se usaron como

40 controles al inocular cada uno S.C. con 1×10^3 PFU de UCD59 de RhCMV. Se colectaron muestras longitudinales de plasma, saliva, y orina después del desafío para evaluar los parámetros virales e inmunes de la infección por virus de desafío.

45 Los NAb a silvestre (es decir, funcional) de la proteína rhcmvIL-10 se cuantificaron por el nivel (por ciento) de actividad de rhcmvIL-10 después de la adición del plasma de animales desafiados post-vacunados y post-RhCMV. Los cuatro animales inmunizados desarrollaron NAb para rhcmvIL-10 después de la segunda inmunización con proteína. Todos los títulos disminuyeron a los niveles basales en el momento de la tercera inmunización con proteína a la semana 26. Tres de los cuatro animales desarrollaron títulos de NAb destacados que fueron indistinguibles de los títulos de NAb observados en macacos infectados naturalmente con RhCMV. Los títulos de NAb detectados en el cuarto animal después de la tercera

50 y última inmunización de refuerzo con proteína estuvieron en el extremo inferior del intervalo normativo de los títulos de NAb en macacos infectados con RhCMV (Figura 13).

Los tres animales con NAb detectables en el momento del desafío (semana 34) desarrollaron respuestas de NAb de memoria dentro de las 2-3 semanas posteriores al desafío con RhCMV. El animal restante no desarrolló aumentos

55 detectables en los títulos de NAb contra rhcmvIL-10 posterior a la inoculación con RhCMV.

El ADN se purificó a partir de hisopos orales y orina para cuantificar el número de genomas de RhCMV por mililitro de fluido corporal mediante PCR en tiempo real (Tabla 5). Los cuatro monos controles se volvieron positivos para el ADN de RhCMV en los hisopos orales a las 41 semanas (7 semanas después del desafío con RhCMV a la semana 34), y todos

60 fueron positivos para el ADN de RhCMV en la orina a la semana 46. Por el contrario, sólo dos de los animales vacunados fueron positivos para el ADN de RhCMV en momentos únicos (semana 41 y semana 46), mientras que los otros dos vacunados permanecieron negativos en la detección de RhCMV en hisopos orales. De manera similar, solo 1 de los vacunados fue positivo para el ADN de RhCMV en varios momentos. Todos los otros vacunados permanecieron negativos. Para evaluar mejor la carga infecciosa representada por la eliminación de RhCMV en saliva u orina, se calculó un Área Bajo la Curva (AUC) para sumar el RhCMV total diseminado en estos dos sitios de eliminación del HCMV. El nivel

65

acumulativo de eliminación de RhCMV se ha reducido profundamente y significativamente por la previa inmunización con versiones no funcionales de rhcmvIL-10.

Este estudio demuestra que la inmunización de macacos rhesus con versiones mutadas de rhcmvIL-10 puede (A) estimular la generación de anticuerpos que neutralizan la actividad funcional de rhcmvIL-10 silvestre, y (B) dramáticamente alteran el curso de la infección por RhCMV, en comparación con monos controles sin vacunar. Juntos, estos datos muestran que laS proteínas de evasión inmunitaria de HCMV pueden ser especialmente susceptibles a la inhibición mediada por vacuna.

Ejemplo 4. Direccionamiento a la Vía de Señalización de IL-10 como una estrategia de Vacuna para HCMV

Muchos patógenos evolutivamente dispares comparten una característica común de sus historias naturales: la explotación de las vías de señalización mediadas por el receptor de alta afinidad para IL-10 (IL-10R) y la subversión de la inmunidad protectora. Las estrategias de los patógenos involucran las propiedades antiinflamatorias de la IL-10 celular del huésped (cIL-10) o una proteína IL-10 codificada por el patógeno para permitir el privilegio inmune, la tolerancia, y/o la supresión inmune. HCMV codifica una IL-10 viral (cmvIL-10) que ha sufrido una extensa deriva genética de cIL-10, cmvIL-10 aún exhibe casi actividad funcional idéntica a cIL-10 en células linfoides. Basado en las propiedades in vitro de cmvIL-10, es probable que cmvIL-10 module las respuestas inmunitarias del huésped ambas, las respuestas inmunitarias innatas y adaptivas para facilitar la eliminación de los viriones de la progenie y un estado infectado a largo plazo dentro de un huésped inmune. Para probar esta hipótesis, macacos rhesus, sin infectar con CMV de rhesus (RhCMV), se inmunizaron mediante el uso de una estrategia que bloquea efectivamente el acoplamiento de IL-10R al ortólogo RhCMV de cmvIL-10 (rhcmvIL-10). Los animales inmunizados se desafiaron subsecuentemente con 1000 PFU de una cepa de RhCMV (UCD59) que se destaca por (i) el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares al sitio subcutáneo de inoculación, y (ii) la eliminación sostenida de títulos elevados de virus en saliva y orina. Los animales inmunizados/desafiados demostraron reducciones prominentes en los niveles locales y sistémicos de replicación del virus de desafío. Los vacunados se caracterizaron por (i) menos células infectadas y menos PMN infiltrante en el sitio de inoculación, y (ii) grandes reducciones en la frecuencia y magnitud de RhCMV detectable en saliva y orina, en comparación con monos controles inmunizados de forma simulada. Estos datos demostraron que bloquear la vía de señalización de IL-10 genera un nivel dramático de inmunidad protectora contra infección por RhCMV de desafío, y ofrece estrategias de vacunas novedosas contra HCMV.

Ejemplo 5. Direccionamiento mediado por vacuna de IL-10 viral- para controlar la eliminación y reinfección de HCMV

Las respuestas inmunitarias a la infección por citomegalovirus de humano (HCMV) en aquellos con inmunidad funcional presentan paradojas con ramificaciones clínicas potencialmente devastadoras para las personas sin competencia inmunológica. La búsqueda de casi cuatro décadas de una vacuna licenciada que confiera inmunidad protectora contra el HCMV se ha visto obstaculizada por múltiples factores, que incluyen dos aparentes contradicciones sobre la historia natural del HCMV. (1) HCMV se considera generalmente ser un virus con bajo potencial patogénico en huéspedes inmunocompetentes. Sin embargo, el virus es extremadamente eficiente para mantener una persistencia de por vida en presencia de esas mismas respuestas inmunitarias que limitan efectivamente los resultados clínicos. Similar a todos los herpesvirus, un rasgo distintivo de la persistencia de HCMV es la reactivación de los genomas virales latentes y la producción de viriones infecciosos que pueden diseminarse a los fluidos corporales más allá de la resolución de la infección primaria. La transmisión horizontal de HCMV representa una amenaza infecciosa para aquellos con mayor riesgo de infección primaria por HCMV, particularmente los fetos que tienen madres sin inmunidad preconcepcional al HCMV. Una gran cantidad de pruebas también destaca otra ambigüedad sobre la inmunidad de HCMV. (2) Las respuestas robustas neutralizantes y citotóxicas a los antígenos de HCMV generadas durante la infección primaria y a largo plazo, que protegen generalmente contra la secuela viral, protegen incompletamente contra la reinfección con viriones transmitidos horizontalmente. Existen ahora una gran cantidad de pruebas que mujeres con previa inmunidad puede reinfectarse subclínicamente con variantes antigénicamente distintas de HCMV que pueden transmitirse verticalmente a otros fetos. Como con la infección primaria durante el embarazo en mujeres no inmunes, la reinfección en mujeres inmunes puede conducir también a déficit permanente neurológico en el individuo infectado congénitamente. Dado la reconocida necesidad clínica de una vacuna contra HCMV, es imperativo para el desarrollo de tal vacuna un mejor entendimiento de estas complejidades particulares de las interacciones HCMV-huésped. Esta invención demuestra que existe un nexo clave que vincula las interacciones virus-huésped, la persistencia, y la reinfección que es susceptible a la intervención mediada por vacuna.

Específicamente, la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped por HCMV, especialmente aquellas que ocurren en la etapa más temprana de la infección a través de la funcionalidad de la proteína interleucina-10 codificada por HCMV (cmvIL 10), permite el establecimiento de un estado de reactivación viral crónica después de la infección primaria y la eliminación sistémica de viriones de la progenie más allá sitios mucosos de reinfección. La presente invención desarrolla el concepto que el aumento posterior a la exposición de las respuestas de anticuerpos neutralizantes (NAb) a cmvIL10 en individuos infectados con HCMV reducirá significativamente (1) la propagación viral en fluidos corporales y (2) aumentará la resistencia mediada por el sistema inmunitario a la reinfección con cepas variantes antigénicamente de HCMV.

Este concepto se basa en estudios previos que evalúan la funcionalidad *in vitro* de cmvIL10 y la caracterización de la modulación *in vivo* de las respuestas inmunitarias del huésped por la proteína IL-10 codificada por CMV de rhesus (RhCMV) (rhcmvIL10). Los estudios se realizan en el modelo de macaco rhesus de persistencia de HCMV y patogénesis para determinar por separado si direccionamiento mediado por vacuna de rhcmvIL-10 reduce la eliminación de RhCMV en los fluidos corporales y/o el potencial de reinfección en monos previamente infectados con RhCMV. Estos estudios proporcionan también una base mecanística para la atenuación mediada por rhcmvIL-10 de las respuestas inmunitarias antivirales del huésped, que permite la optimización del diseño de vacunas.

Un impulso para el desarrollo de una vacuna contra HCMV ha sido la protección de los fetos de las consecuencias devastadoras de HCMV intrauterino. La población objetivo principal de vacunación consiste en mujeres seronegativas en edad fértil que están en alto riesgo de infección primaria por HCMV y transmisión transplacental de HCMV. Dado que la tasa de infección congénita es ~0,7 %, la preponderancia abrumadora de infecciones primarias resulta de la transmisión horizontal de HCMV en fluidos corporales. En consecuencia, las reducciones mediadas por vacuna en la eliminación de HCMV podrían ser beneficios clínicos grandes al reducir la frecuencia a la que las mujeres sin inmunidad preconcepcional adquieren infecciones primarias durante el embarazo. Estudios recientes han documentado la infección congénita en poblaciones con seroprevalencia casi universal al HCMV a edades tempranas, lo que demuestra que la inmunidad previa al HCMV no protege suficientemente contra la reinfección. Mientras que las razones permanecen para resolver, aumentar las respuestas inmunitarias en estas mujeres para prevenir la reinfección también reduciría enormemente los costos personales y sociales asociados con los resultados clínicos permanentes que resultan de una infección congénita. El objetivo de esta invención es cambiar notablemente el balance virus-huésped a largo plazo a uno que sea decididamente a favor del huésped al neutralizar la capacidad de cmvIL10 para atenuar las respuestas inmunitarias innatas y efectoras/de memoria.

Muchos patógenos de mamíferos evolutivamente dispares comparten una característica común de sus historias naturales: la explotación de las vías de señalización mediadas por el receptor de alta afinidad para IL-10 (IL-10R) y la subversión de la inmunidad protectora. Múltiples virus (*por ejemplo* CMV (1-3), Virus de la coriomeningitis linfocítica - LCMV (4-6), Dengue (7,8), VIH (9,10), papilomavirus humano (11,12), virus de la Hepatitis B y C (13-17)), bacteria (*por ejemplo*, *M tuberculosis* (18,19), *C. trachomatis* (20), y *L. monocytogenes* (21,22)), protozoa (*por ejemplo*, *Leishmania* (23,24), *Plasmodium* sp. (25)), y hongos (*por ejemplo*, *Paracoccidioides brasiliensis* (26,27)) han utilizado la activación del IL-10R para facilitar el establecimiento y mantenimiento de una infección persistente, a menudo en relación con los resultados patogénicos en el huésped infectado (28). Mientras que las estrategias pueden variar entre organismos, estas involucran las propiedades antiinflamatorias de la IL-10 celular del huésped (cIL-10) o una proteína IL-10 codificada por el patógeno para permitir microambientes de privilegio inmune, tolerancia, y/o supresión inmune, similar a aquellos observados con algunas ontegenias de enfermedades no infecciosas (28-34).

IL-10 es un regulador inmune central durante la infección por CMV, que involucra la regulación hacia arriba de cIL-10 y/o la expresión de cmvIL-10. Ambos HCMV y RhCMV codifican un ortólogo viral de cIL-10 cada uno de los cuales exhibe deriva genética extensa de la cIL-10 de su huésped^{41,42}. A pesar de la variación de secuencia, cmvIL-10 conserva las propiedades inmunosupresoras de cIL-10 en múltiples tipos celulares *in vitro*, especialmente en células dendríticas (DC), que unen inmunidad innata y adaptiva (2,43-48).

Existen necesidades clínicas convincentes que apoyan la justificación de la alteración posterior a la exposición del balance HCMV-huésped. El mayor riesgo infeccioso para un feto, en términos tanto del potencial como de la gravedad de la infección congénita, se produce en el contexto de la infección primaria por HCMV en una mujer que carece de inmunidad preconcepcional. Justificadamente, los esfuerzos de la vacuna contra el HCMV se han dirigido contra la protección de las mujeres embarazadas de la infección primaria por el HCMV. Sin embargo, la reinfección de mujeres seroinmunes con variantes antigénicas de HCMV constituye también una fuente significativa de infección congénita y secuelas (49-57). La probabilidad de infección en mujeres embarazadas, y por extensión la probabilidad de infección fetal, se relaciona con la frecuencia de exposición de la mucosa a fluidos corporales infecciosos de un individuo infectado (56,58-63). HCMV puede excretarse en fluidos corporales mucho después de la resolución de la infección primaria, lo que aumenta las probabilidades de transmisión horizontal (64-73). Las terapias que reducen la frecuencia y/o la magnitud de eliminación de HCMV pudiera reducir correspondientemente el riesgo de transmisión a mujeres embarazadas independiente a si tienen o no inmunidad preconcepcional al HCMV.

Por extensión, bloquear el acoplamiento de IL-10R a cmvIL-10 pudiera aumentar también la resistencia a la reinfección por HCMV. La tasa anual de reinfección por HCMV (~10 %) es cercana a la de la infección primaria, a pesar de una extraordinaria devoción del repertorio inmune a los antígenos de HCMV. En portadores de HCMV sanos a largo plazo, ~ el 10% de las células T de memoria son específicas para HCMV y se generan NAb contra múltiples glicoproteínas virales (74-79). Una explicación para la alta tasa de reinfección se basa en la variación antigénica en epítomos importantes del virus entrante en comparación con las especificidades inmunitarias existentes del huésped infectado. Dada la amplitud de la inmunidad de HCMV, no parece que la variación antigénica por sí sola pueda explicar la reinfección de HCMV en un huésped inmune. Más bien, sugiere que existe una parálisis inmune parcial de las funciones efectoras/de memoria contra epítomos conservados codificados por el virus re infectante, lo que permite la eliminación de viriones de la progenie más allá del sitio mucoso de reinfección. La expresión de IL-10 viral por el "desafío" virus es consistente con tal escenario, basado en las funcionalidades *in vitro* y *in vivo* de cmvIL-10 y rhcmvIL-10 (2,34,43-47,80,81). Reforzar la eficacia protectora de respuestas inmunitarias anti-HCMV en mujeres infectadas a través de un aumento dirigido de la inmunidad

preexistente también protegería al feto de una infección congénita después de la reinfección de la madre. El objetivo declarado a largo plazo de una vacuna contra el HCMV que proteja contra la infección primaria ha sido excesivamente difícil de alcanzar (82). Evaluar si la reducción de la frecuencia de reinfección o la magnitud de eliminación de HCMV puede prevenir la infección congénita ha permanecido estrictamente como conjeturas. En esta invención, se usa un huésped primate para determinar si cmvIL-10 representa un componente especialmente vulnerable del proteoma de HCMV al que puede dirigirse la vacuna para reducir el potencial de eliminación y reinfección.

Este enfoque experimental en monos rhesus toma ventaja de un resultado intrigante de la prolongada relación coevolutiva entre el CMV de primate y sus huéspedes particulares. Ha existido deriva genética extensa de cmvIL-10 y rhcmvIL-10 de cIL-10 de humano y mono, respectivamente. *Herpesviridae*, que incluye CMV, son virus antiguos que evolucionaron de un progenitor hace más de 200M años (83). Más de la mitad de los marcos abiertos de lecturas (ORF) del genoma de HCMV puede eliminarse sin afectar la replicación en fibroblastos (84,85). Como puede esperarse para un virus con orígenes antiguos, una gran porción del ORF de HCMV que es prescindible para la replicación *in vitro* codifica funciones que modulan respuestas inmunitarias innatas y adaptivas del huésped. Estas incluyen proteínas virales que interrumpen la presentación de antígeno y alteran el tráfico, la señalización, la activación y la viabilidad celular. Después de la divergencia evolutiva de los primates y roedores, un progenitor de CMV de primate transdujo el gen de cIL-10 de su huésped primate progenitor. El gen de IL-10 viral gene todavía existe dentro de HCMV, RhCMV, y otros CMV de monos (42), aunque se eliminó aparentemente durante la evolución de CMV41 de chimpancé. Como cada CMV de primate coespecificó con su huésped, los genes virales de IL-10 experimentaron una deriva genética extrema del gen cIL-10 de su huésped, de manera que las proteínas IL-10 virales comparten solo una identidad del 25-27 % con la cIL-10 de su huésped (42). La extensión de la deriva genética en los ortólogos virales se destaca por los hechos de que (i) las proteínas primates cIL-10 comparten > 95 % de identidad, y (ii) los ortólogos de la IL-10 viral son tan divergentes entre sí como lo son del cIL-10 de su huésped. Mientras que comparten sólo el 31 % de identidad de aminoácidos, cmvIL-10 y rhcmvIL-10 son altamente estables en secuencia (>98 % de identidad) entre diferentes cepas de HCMV y RhCMV, respectivamente (86,87). Las funcionalidades de cmvIL-10 son casi idéntica a las de cIL-10 (2,34,43-47,80,81). No hay evidencia que cmvIL-10 haya evolucionado nuevas respuestas de señalización mediadas por IL-10R. La deriva interespecífica de las proteínas IL-10 virales fue probablemente impulsada como una selección compensatoria a algún aspecto de la evolución de su huésped. Dado que la afinidad de unión de cmvIL-10/IL-10R muestra ser superior a la de cIL-10/IL-10R (48), el mantenimiento de la mayor afinidad de unión al IL-10R del huésped probablemente fue crítico en la configuración de la secuencia particular de IL-10 viral. Como resultado, la cIL-10 transducida original ha pasado de lo que antes era una proteína "propia", expresada en el contexto de la infección viral, a una que ahora es altamente reconocible por el sistema inmunitario del huésped.

Los estudios empleados para esta invención demuestran los siguientes puntos. (1) Los monos rhesus expuestos de manera natural a RhCMV silvestre o inoculados experimentalmente con cepas diferentes de RhCMV desarrollan respuestas de unión a rhcmvIL-10 y NAb coincidentes con el desarrollo de respuestas de Ab a otros antígenos virales. (2) Mientras que los títulos altos de NAb contra rhcmvIL-10 se detectan en el plasma de animales infectados, los títulos de IgG mucosal son probablemente insuficientes para neutralizar rhcmvIL-10 secretado de las células infectadas en la mucosa y submucosa. (3) Las mutaciones sitio dirigidas se han introducido en rhcmvIL-10, y las proteínas recombinantes resultantes no exhiben unión a IL-10R, y ni actividad funcional en las células linfoides de rhesus. (3) Los títulos de NAb pueden aumentarse >10-100 veces en los monos infectados con RhCMV reforzados con proteína rhcmvIL-10 mutada. (4) Los títulos de NAb pueden estimularse en monos vírgenes inmunizados con rhcmvIL-10 no funcional. (5) Los monos vírgenes inmunizados con rhcmvIL-10 no funcional y subsecuentemente desafiados con RhCMV silvestre exhiben parámetros de infección por RhCMV profundamente reducidos tanto en el sitio de inoculación como en los sitios de excreción de virus. (6) No existe evidencia que la generación de Ab contra rhcmvIL-10 estimula anticuerpos con reactividad cruzada con cIL-10 de rhesus. Estos estudios son los primeros en caracterizar la inmunogenicidad de una proteína de evasión inmunitaria de CMV, y demuestran la viabilidad de nuevas estrategias de vacunas que se dirijan específicamente a esta clase de proteínas de CMV. La presente invención establece también nuevos paradigmas para reducir la infección congénita al enfocarse en la eliminación del virus y aumentar la resistencia mediada por el sistema inmunitario a la reinfección en huéspedes infectados. Los resultados de estos estudios son importantes para otros aspectos de la infección congénita. La reactivación maternal de genomas virales latentes es otra fuente de viriones de la progenie que atraviesan la interfaz maternal-fetal (88). Las reducciones estimuladas por vacuna en la eliminación en la cavidad oral y el tracto urogenital deben ser operativas en aquellos sitios de reactivación que dan lugar a virus transmitido transplacentalmente. Además, si la expresión de rhcmvIL-10 es crítica para la reinfección de un individuo con previa inmunidad, es probablemente irrelevante si la previa inmunidad se genera a partir de una infección anterior o vacunación anterior. Estos hallazgos indican que cmvIL-10 debe incluirse en cualquier cóctel de vacuna contra HCMV para potenciar la eficacia protectora generada por los otros antígenos dentro de la vacuna.

Esta invención toma también ventaja del entendimiento de la infección por RhCMV en cohortes mezcladas de monos infectados y no infectados. Las cohortes de mono recapitulan los desafíos a los que se enfrentan los ensayos de vacunas contra HCMV en humanos, que incluye la exposición repetida de la mucosa a cepas RhCMV con variantes antigénicas que conducen a una propagación altamente eficaz del virus a las cohortes vírgenes y la presencia de múltiples variantes genéticas dentro de un huésped infectado (86, 89-91).

Cuantificación de cambios en la eliminación de RhCMV en saliva y orina a largo plazo, monos infectados con RhCMV después de la inmunización con formas inactivas funcionalmente de rhcmvIL10

El objetivo de estos estudios es demostrar que la alteración de vía de señalización de IL-10 en monos infectados con RhCMV significativamente atenúa una característica distintiva de la infección persistente de RhCMV y HCMV. Estos estudios mostrarán que bloquear el acoplamiento de IL-10R a rhcmvIL-10 en animales sanos, infectados a largo plazo genera una reducción relevante biológicamente en la eliminación de RhCMV en fluidos corporales. El diseño experimental involucra la cuantificación de la frecuencia y magnitud de la eliminación de RhCMV (saliva y orina) en monos infectados con RhCMV durante 12 semanas de observación de referencia, inmunización con versiones no funcionales de rhcmvIL-10 o antígeno control y observación después de la vacunación. Los componentes claves requeridos para estos estudios incluyen las tecnologías siguientes: (i) interrogatorio riguroso de la eliminación longitudinal de RhCMV; (ii) detección de NAb contra rhcmvIL-10; (iii) refuerzo de NAb contra rhcmvIL-10 sin inducir NAb de reactividad cruzada a cIL-10; y (iv) la cuantificación de los títulos de Ab mucosal contra antígenos de RhCMV, que incluye rhcmvIL-10.

Historia natural de RhCMV

Como la infección por HCMV en humanos, particularmente en niños, RhCMV se elimina en saliva y orina durante meses a años después de la infección primaria natural o inoculación experimental. La importancia de la eliminación viral en la historia natural de RhCMV se destaca por la alta tasa de transmisión horizontal de RhCMV a cohortes vírgenes en poblaciones mixtas de animales infectados y no infectados (Figura 14). En cohortes de cría alojadas en corral de ~ 100 animales que varía en edad hasta los 20 años, casi el 100 % de los animales recién nacidos (N = 25) se convirtieron en seropositivos para el Ab IgG contra RhCMV dentro de 1 año de edad (Figura 14A) (91). La velocidad de seroconversión mostró una duplicación de nuevos animales seropositivos cada 5-6 semanas. En otro estudio en el cual 15 juveniles no infectados de 1 año de edad se alojaron con un único adulto infectado con RhCMV, el número de animales seropositivos se duplicó cada 7-8 semanas (Figura 14B). Los factores primarios para la diseminación horizontal de RhCMV en estas cohortes son la alta velocidad de eliminación de RhCMV en saliva y orina y la estructura social interactiva de los monos rhesus. Un estudio transversal de monos de 3 a 5 años alojados en corral (100 % infectados con RhCMV) mostró que ~ 75 % de los monos (N = 50) tienen ADN de RhCMV en la saliva, lo que indica que la mayoría de los animales aún eliminan RhCMV > 2-4 años después de la exposición primaria al virus. Un análisis prospectivo de la eliminación de RhCMV, que involucra la cuantificación del ADN de RhCMV en la saliva y la orina cada semana durante 12 semanas, mostró que una característica distintiva de la infección por RhCMV a largo plazo es la eliminación persistente del virus (Figura 15). La mayoría de los animales tuvieron ADN de RhCMV detectable en saliva en al menos la mitad de los puntos de tiempo semanalmente. Todos los animales tuvieron RhCMV detectable en orina en al menos 3 de los 12 puntos de tiempo. La carga infecciosa de RhCMV en saliva durante las 12 semanas, calculada como el Área Bajo la Curva, varió de una ausencia de ADN de RhCMV en 5 animales a $>10^3$ - 10^6 genomas en 9 animales.

En conjunto, estos resultados hacen énfasis en que el modelo de mono rhesus es un sustituto apropiado para la infección por HCMV para evaluar las estrategias de intervención que se enfocan en la interrupción de la eliminación viral como un medio de impedir la diseminación horizontal de virus en poblaciones de animales infectados y no infectados. Los niños infectados con HCMV que excretan el virus, incluso en la saliva, presentan un alto riesgo de transmisión horizontal a mujeres embarazadas y subsecuente infección congénita (61,63,92-102). De manera importante, estos métodos para evaluar perfiles de eliminación longitudinal en animales infectados permiten determinar a los estudios propuestos si el refuerzo de los títulos de NAb contra rhcmvIL-10 reduce la eliminación a largo plazo.

La inmunización de monos vírgenes contra fosfoproteína 65 de RhCMV (pp65), glicoproteína B (gB), y la proteína inmediata-temprana 1 (IE1) generó disminuciones significativas en eliminación oral durante las 20 semanas de observación posteriores al desafío en un subconjunto de animales vacunados en comparación con controles no inmunizados (Figura 16) (103). Estos resultados indican que la vacunación contra inmunógenos relevantes de RhCMV, tal como pp65, gB, y IE1, puede ofrecer un nivel parcial de inmunidad protectora, como se mide en las reducciones en la excreción oral de RhCMV. Sin embargo, la expresión de rhcmvIL-10 por el virus del desafío atenúa la protección conferida por estos antígenos de vacuna. Enfoques paralelos se usarán para analizar esto. En estudios independientes, monos no infectados se inmunizarán con una combinación de antígenos para determinar si la inclusión de rhcmvIL-10 M1/M2 aumenta la eficacia protectora generada por los otros antígenos. Esta invención aborda un tema relevante para todos los estudios de vacunas contra HCMV, es decir, si rhcmvIL-10 debe ser un componente de cualquier vacuna contra HCMV para anular la modulación mediada por IL-10 viral de las respuestas inmunitarias estimuladas por la vacuna.

Expresión de e inmunización con rhcmvIL-10

Para inmunizar monos con rhcmvIL-10, la secuencia codificante se modificó genéticamente para formular versiones no funcionales de la proteína, por lo tanto, evitando la vacunación con la forma de la proteína inmunosupresora, silvestre. Se usaron métodos basados en la estructura para introducir mutaciones sitio específicas mínimas dentro de rhcmvIL-10 de manera que las variantes mutadas exhibieran el fenotipo dual de fallar en (1) unirse a IL-10R y (2) suprimir las funciones efectoras linfoides. Dos mutantes, M1 y M2, contienen dos aminoácidos alterados cada uno (M1: posiciones 38 y 144; M2: posiciones 142 y 144, basad en la numeración de aminoácidos de IL-10 de humano). El objetivo fue minimizar la unión a IL-10R mientras que conservara la máxima inmunogenicidad. Se usaron dos ensayos para demostrar la ausencia de funcionalidad silvestre: proliferación de células TF-1 eritroleucémicas humanas transfectadas con la cadena humana de IL-10R1 (111); e inhibición de la producción de IL-12 en células linfoides de rhesus activadas con LPS.

- La proliferación de las células TF1 hIL10R1 es dependiente de IL-10, y sólo cIL-10 humana y rhcmvIL-10 silvestre (WT) indujeron la proliferación de TF1 a lo largo de una amplia concentración de citocina (Figura 17A). Por el contrario, los fenotipos de las dos versiones mutadas de rhcmvIL -10 (M1 y M2) fueron idénticos a las células tratadas de forma simulada; hubo una completa ausencia de proliferación de TF1 a concentraciones que variaron de 4×10^{-3} -750 ng/ml. Un segundo ensayo se realizó para probar la capacidad de M1 y M2 de suprimir la producción de IL-12 en n células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de rhesus estimuladas con lipopolisacáridos (LPS). Mientras que rhcmvIL-10 WT potentemente inhibió la expresión de IL-12 en PBMC tratados con LPS, M1 y M2 fallaron en inhibir la expresión de IL-12 mediante el uso de PBMC de macacos (se muestran dos animales, Figura 17B).
- Se usaron estrategias alternas de vacunas en monos se para mostrar que rhcmvIL-10 M1 y M2 fueran inmunogénicos. En la primera, monos infectados con RhCMV se inmunizaron con M1 y M2 mediante el uso de una sensibilización combinada de ADN y refuerzo con proteína. El ELISA muestra que el 100 % de los monos infectados con RhCMV aumentaron los Ab de unión a rhcmvIL-10. Se desarrolló un ensayo de neutralización en el cual se cuantificó la producción de IL-12 en PBMC de rhesus activados con LPS incubados con rhcmvIL-10 WT y plasma de monos infectados. Los monos infectados con RhCMV muestran un amplio intervalo en plasma de los títulos de NAb contra rhcmvIL-10 (Figura 18), a pesar de los títulos de Ab de unión casi comparables. Se evaluaron las respuestas de NAb contra rhcmvIL-10 en 6 monos infectados con RhCMV que se inmunizaron con vectores de expresión de plásmidos para M1 y M2 seguidos de dos refuerzos con proteínas M1 y M2 recombinantes purificadas (Figura 19). Los aumentos en los títulos de Ab de unión a rhcmvIL-10 se encontraron en los 6 animales después de la vacunación, y los aumentos en NAb se observaron en 5 de 6 vacunados. Los NAb se estimularon en 3 animales desde casi no detectables (preinmunización) a niveles que fueron ≥ 100 veces mayores, y muy por encima de la mediana de las respuestas de NAb observadas en monos infectados naturalmente (Figura 18). De manera similar, dos animales con respuestas altas de NAb contra rhcmvIL-10 antes de la inmunización fueron aumentados a niveles más altos.
- Cuatro monos rhesus no infectados con RhCMV se inmunizaron también con el ADN heterólogo sensibilizador (una inmunización) y refuerzo de proteína (tres inmunizaciones) y después se desafiaron con RhCMV para determinar si la inmunización contra esta sola proteína de evasión viral podría alterar el curso de desafío con RhCMV (Figura 13A). Los cuatro animales desarrollaron robusto Ab de unión a rhcmvIL-10. Tres de los animales también desarrollaron fuertes respuestas de NAb contra rhcmvIL-10, mientras que un animal desarrolló respuestas de NAb transientes que estuvieron sólo por encima del nivel de detección en el momento del desafío viral.
- Los monos se desafiaron con una variante de RhCMV (UCD59; 1,000 PFU) mediante una ruta de infección subcutánea (S.C.) (113). UCD59 se destaca por la eliminación persistente del virus en saliva y orina después de una fase variable de estado latente después de la inoculación S.C. (113). Todos los animales controles fueron positivos uniformemente para el ADN de RhCMV en la saliva en las 6-7 semanas después del desafío. Una vez que comenzó la eliminación, los animales controles fueron positivos para RhCMV en la saliva 6-9 veces cada uno durante los 9 puntos de tiempo analizados (Figura 13B). En marcado contraste, el ADN de RhCMV ha sido indetectable en 2 monos vacunados hasta las 20 semanas después del desafío. En los otros dos vacunados, el ADN de RhCMV se ha detectado sólo 2 y 3 veces de los 9 puntos de tiempo. Además a una reducción significativa en la frecuencia de eliminación en los animales vacunados, la magnitud de eliminación se redujo también significativamente (AUC de Saliva, Figura 13C). Este estudio es el primero en mostrar que la inmunización contra una proteína viral de evasión inmunitaria puede generar cambios relevantes biológicamente en la infección viral de desafío, particularmente en relación con reducir el potencial para la transmisión horizontal de los viriones en fluidos corporales.
- Un importante enfoque de estos estudios está en las respuestas de anticuerpos en las mucosas. Los títulos de NAb contra rhcmvIL-10 en tejido deben ser los más relevantes para el control de la eliminación mediado por el sistema inmunitario. Tanto rhcmvIL-10 como cmvIL-10 son proteínas secretadas (43,114), y resultados del proteoma de HCMV indican que cmvIL-10 no está presente en el virión de HCMV (115). La IgG de saliva se evaluará para proporcionar una medida apropiada de los niveles de NAb contra rhcmvIL-10 en tejido ya sea secretada por células plasmáticas en la submucosa o transudada del plasma. Como las respuestas de IgG contra HCMV (112), los títulos de IgG contra RhCMV en saliva son $\sim 0,13$ % de aquellos en plasma. Basados en las respuestas de NAb en plasma (Figura 18), debe haber poca neutralización de rhcmvIL-10 en la submucosa. Un elemento clave de estos estudios es demostrar que la inmunización con rhcmvIL-10 refuerza los títulos de NAb en saliva como una medida apropiada de los títulos aumentados en tejidos.
- #### Animales y colección de muestras
- Se usarán para este estudio animales seropositivos a RhCMV, genéticamente no relacionados, (~ 2 años de edad) alojados al aire libre en el CNPRC. Sangre, orina, e hisopos orales se colectarán semanalmente de 20 animales en el transcurso de 36 semanas, que se dividirán en tres fases. Las muestras colectadas durante el periodo inicial de observación de 12 semanas (semanas 1-12) determinarán los basales de los parámetros inmunitarios y virales de la infección por RhCMV (Tabla 6), de acuerdo con protocolos conocidos (103,113,116). Al comenzar la semana 12, una mitad de los animales se inmunizarán con una mezcla de las proteínas recombinantes rhcmvIL-10 M1 y M2. Los animales restantes se inmunizarán con una proteína no específica (influenza) para el control de cualquier cambio en la eliminación relacionado con efectos inmunitarios no específicos. La base para la asignación de ambos grupos de tratamiento se describe a continuación. Los animales se reforzarán en las semanas 18 y 24, durante las cuales se colectarán

semanalmente en sangre, orina, e hisopos orales. Las muestras se colectarán semanalmente durante una fase final (semanas 25-36) para determinar si existen cambios permanentes en la eliminación. La sangre se procesará para obtener PBMC y plasma, el último se usará para ensayos de ADN e inmunitarios. La saliva se procesará tanto para PCR de tiempo real y ensayos inmunitarios. Los específicos que se realizarán con las diferentes muestras de fluido se enumeran en la Tabla 6. El número propuesto para cada grupo de estudio (N= 10) se basa en estudios de inmunización con rhcmvIL-10 en monos inmunes y vírgenes (Figuras 19 y 13A). De un total de 10 animales inmunizados, 2 (20 %) no desarrollaron respuestas de NAb aumentadas, aunque ambos desarrollaron títulos de Ab de unión aumentados. Un tamaño de grupo inicial de 10 animales incluye el potencial para ~2 (20 %) no desarrollar títulos de NAb aumentados después de la inmunización. Esto dejaría un total de 8 animales que se espera que respondan, que es el número mínimo requerido para permitir diferencias estadísticamente significativas y científicamente relevantes entre los diferentes grupos de tratamiento. Basado en un análisis de poder de 1 cola de la carga infecciosa total en saliva durante 21 semanas en un estudio previo (103), el tamaño de los grupos de N=8 proporciona un poder del 88 % para detectar una diferencia de 1-log entre grupos (alfa = 5 %) para la eliminación acumulada del virus después de la inmunización.

15 Asignación de los animales a los grupos de tratamiento

Los animales se asignarán al grupo de tratamiento en la semana 12 basado en una estratificación jerárquica de los resultados colectados durante las semanas 1-12. El objetivo general es igualar la distribución de los animales a cada grupo basado en las respuestas inmunitarias anti-rhcmvIL-10 y anti-RhCMV. La base primaria para la asignación de los animales al grupo dependerá de las respuestas de NAb contra rhcmvIL-10 en saliva. Basado en el análisis de NAb en plasma contra rhcmvIL-10 (Figura 18), se anticipa que habrá una distribución similar de las respuestas de NAb en saliva. Los animales se asignarán a los grupos de manera que exista una distribución igualitaria de respuestas de NAb en ambos grupos. Las respuestas de NAb en saliva se ordenarán por el cálculo de NAb acumulado durante las semanas 1-12 mediante el uso de un enfoque de Área Bajo la Curva (AUC) similar al que se usó para determinar las reducciones mediadas por vacuna en la eliminación después del desafío primario con RhCMV (103) (Figura 16). Cada animal en el CNPRC se tipifica rutinariamente mediante mapeo microsatélite para el parentesco y haplotipo del MHC clase I (Mamu A*01, B*01, y B*17). La distribución de animales a cada grupo incluirá también un objetivo de igualar la diversidad genética entre ambos grupos. Si los NAb contra rhcmvIL-10 son indetectables en saliva, se usarán los NAb en plasma contra rhcmvIL-10 como una base para la asignación. Luego de la distribución basado en NAb contra rhcmvIL-10, se aplicará un criterio secundario, si se necesita, mediante el uso de los títulos neutralizantes para la infectividad de RhCMV.

Inmunización

Las rhcmvIL-10 M1, M2, y WT se expresarán en células S2 Schneider de *Drosophila* y se purificará por cromatografía de afinidad mediante el uso de perlas de agarosa acopladas con la cadena humana de IL-10R1, de acuerdo con protocolos conocidos (48). Las proteínas se confirmarán para pureza (transferencia western) y la ausencia de endotoxina. Los animales se inmunizarán por una ruta intramuscular (IM) con 200 µg de rhcmvIL-10 M1 y M2 (100 µg de cada uno) en Montanide ISA 720 (117,118), de acuerdo con protocolos conocidos (103,116). Los animales controles se inmunizarán con la vacuna actual de dosis alta Fluzone (0,5 ml/180 µg de antígenos de influenza A y B; IM en adyuvante) (Sanofi Pasteur). La inmunización con ADN (Figuras 19 y 13A) no se usará para este propósito.

Respuestas inmunitarias antivirales

Se usarán ensayos múltiples para caracterizar las respuestas inmunitarias durante las tres fases de este estudio. ELISA se usará para cuantificar el título y la avidéz de Ab de unión anti-rhcmvIL-10 mediante el uso de rhcmvIL-10 WT como antígeno (2,103,116,119-122). El plasma de monos controles se evaluará por ELISA para detectar respuestas de Ab específicos para influenza mediante el uso de proteínas de influenza como antígeno, y proteínas de huevo entero como controles negativos. Dado que rhcmvIL-10 no se incorpora probablemente a la envoltura del virión, Ab IgA contra rhcmvIL-10 no deben proteger contra la infección. El enfoque primario estará en la IgG, aunque se analizarán las respuestas de la IgA, según sea necesario. Los NAb contra rhcmvIL-10 se cuantificarán. Las muestras de saliva y plasma diluidas se incubarán en presencia o ausencia de rhcmvIL-10 WT durante 3 horas, y después se incubarán (por duplicado) con PBMC de rhesus. LPS (*E. coli* O127:B8; Sigma) se añadirá después a las células (5 µg/mL) durante 24 horas. El sobrenadante se evaluará para detectar IL-12 por ELISA (U-Cytech). La neutralización se calcula como el inverso de la relación de (concentración de IL-12 + rhcmvIL-10 + plasma)/(concentración de IL-12 + plasma solo) y se expresa como el "por ciento de inducción de IL-12 restaurada." Las respuestas humores se evaluarán prospectivamente para cada muestra semanalmente. Los títulos de NAb se estratificarán por el cálculo del AUC durante las semanas 1-12, 12-24, y 25-36 de acuerdo con protocolos conocidos (103). En resumen, el AUC entre dos puntos sucesivos de tiempo se calcula como el área del trapecioide formado por el NAb en aquellos dos puntos de tiempo, y la suma de los valores de AUC individuales representa los NAb acumulados para ese animal durante una fase particular del estudio.

Las respuestas celulares contra RhCMV se evaluarán mediante el uso de viriones inactivados de RhCMV como antígeno y PBMC criopreservados, como se describe (103,116). Las respuestas celulares contra rhcmvIL-10 se medirán de manera similar mediante el uso de una mezcla de rhcmvIL-10 M1 y M2 como antígenos.

65 PCR de tiempo real

ADN se purificará del plasma, saliva, y orina, y se cuantificará para el número de copias del genoma de RhCMV por PCR de tiempo real (2,103,113,116,120-123). Basado en los estudios seroepidemiológicos, la edad de los animales para este estudio (~2 años) es consistente con los animales que se han infectado con RhCMV durante 1-1,5 años. Se estima que >90 % de los animales aún eliminan persistentemente RhCMV en saliva y orina. Los animales se confirmarán para la eliminación de RhCMV en tres puntos consecutivos de tiempo antes del estudio. El perfil de eliminación de cada animal, determinado por el AUC (103), se estratificará por la frecuencia y magnitud de la detección de RhCMV durante las tres fases del estudio de 12 semanas.

Criterios de resultados y análisis estadístico

Existen criterios múltiples de resultados que se evaluará como parte de este estudio (Tabla 7). Cinco aspectos importantes de la historia natural de RhCMV se caracterizarán durante la fase de prevacunación (semanas 1-12) para determinar si hay correlaciones entre la eliminación y cualquier respuesta inmunitaria anti-RhCMV en animales infectados de manera natural (#1-5, Tabla 7). La eliminación incluirá la frecuencia y magnitud de RhCMV (AUC). Los parámetros inmunitarios que se analizarán incluyen respuestas periféricas (NAb y CMI) a antígenos de rhcmvIL-10 y RhCMV, y títulos de NAb en saliva contra rhcmvIL-10. Otro aspecto importante de este estudio será determinar si títulos de NAb en saliva contra rhcmvIL-10 son reflejos de aquellos en plasma, o si las respuestas de IgG detectadas en saliva son independientes de aquellas en plasma. Esto tiene implicaciones para la optimización de la inmunidad mucosal mediada por vacuna contra RhCMV como un modelo para enfoques similares en estudios con humanos. Los parámetros inmunitarios y virales se compararán durante las tres fases del estudio para determinar si la inmunización con rhcmvIL-10 conduce a disminuciones en la eliminación relevantes biológicamente, y si los cambios en las cargas virales de RhCMV viral se correlacionan con las respuestas de NAb y/o CMI aumentadas. Los análisis estadísticos que utilizan pruebas primarias y post hoc apropiadas serán similares a aquellos usados en los estudios que evalúan los cambios relacionados con la vacuna en los parámetros virales después del desafío con RhCMV (103).

Estos estudios permitirán una determinación de si la eliminación de RhCMV en fluidos corporales de animales infectados puede reducirse mediante el refuerzo posterior a la exposición de las respuestas inmunitarias específicas contra rhcmvIL-10. Este enfoque sirve como una medida apropiada de los cambios de la persistencia viral en el huésped y la diseminación horizontal en la población. El enfoque está en NAb contra rhcmvIL-10, pero este enfoque también permite el análisis correlativo de si el CMI periférico también contribuye a las reducciones en la eliminación.

Según los datos preliminares (Figs. 4-7), estos análisis permiten la traducción de los estudios en ratones a un huésped primate que refleja fuertemente la afección humana. Es importante hacer énfasis que los estudios en ratones se enfocaron en las funciones efectoras de las células T en tejidos específicos relacionados con los sitios de persistencia de MCMV, tal como la glándula salival. De manera similar, los presentes estudios se enfocan en el papel del rhcmvIL-10 en facilitar la persistencia en los dos sitios especialmente relevantes para la eliminación de RhCMV, las glándulas salivales y el tracto genitourinario. Las respuestas periféricas a RhCMV y HCMV se destacan por respuestas vigorosas de NAb y células T, consistente con una ausencia de viremia de RhCMV y HCMV en huéspedes infectados a largo plazo. Este modelo se basa en el escenario de que todos los CMV manipulan los microambientes en aquellos tejidos críticos para la liberación de viriones de la progenie para facilitar la diseminación a huéspedes secundarios susceptibles. Estos estudios toman en consideración un elemento clave de los estudios en ratones infectados con LCMV: el aclaramiento de las células infectadas a través de la manipulación terapéutica de la señalización de IL-10/IL-10R o por la "instrucción continua del ambiente antigénico" puede tener una asociación temporal. Cuanto más tiempo se hayan infectado los ratones, menor será la restauración de un estado funcional a las células efectoras (36). Sin embargo, los autores de un estudio de LCMV concluye que, los "componentes de la función de células T CD4+ y CD8+ permanecen intactos y que pueden restaurarse a lo largo de la infección persistente" (36). Este estudio se diseña para observar un estado relativamente temprano de la infección por RhCMV previo a la acumulación de un subconjunto de células T CD8+ diferenciadas terminalmente. En un estudio a gran escala de 100 % monos juveniles (N = 50) y adultos mayores (N = 100) infectados con RhCMV, se encontró que hay un aumento muy importante en células T CD8^{pos}/CD28^{neg}/CD45RA^{pos} (Figura 20), un fenotipo indicativo de células efectoras. El cambio relacionado con la edad en esta población celular, y otras subpoblaciones de células T, es probablemente una combinación de una expansión de relacionada con la edad de las células T efectoras y la disminución en las células T vírgenes (CD28^{pos}) durante el envejecimiento. Los resultados (Figura 20) sugieren que podría haber respuestas diferenciales a la inmunización con rhcmvIL-10 en macacos jóvenes versus más viejos, basado en las diferencias en las frecuencias de los subconjuntos de células T.

Comparación de la reinfección RhCMV en monos inmunes a RhCMV que difieren en la magnitud de sus títulos de NAb contra rhcmvIL10

El número de infecciones congénitas anuales con HCMV en una población se relaciona directamente con la frecuencia de la infección maternal por HCMV antes de la concepción (63,124). Por lo tanto, mientras que la velocidad de la transmisión transplacental es mayor durante la infección maternal primaria que la frecuencia de las infecciones congénitas en mujeres con inmunidad preconcepcional, el último da lugar a un mayor número de infecciones congénitas (57,125). La demostración de que el 10% de las mujeres seropositivas que dan a luz a un infante infectado de forma congénita adquirió una nueva reactividad antigénica a los antígenos de HCMV entre embarazos es una evidencia indiscutible de que la inmunidad previa no protege completamente contra la reinfección con variantes antigénicas de HCMV (54). Mientras que tales casos de infecciones congénitas en mujeres seropositivas se atribuyeron una vez a los casos de reactivación

materna, la evidencia de nuevas especificidades antigénicas es más compatible con la exposición y la transmisión transplacentaria de un virus no endémico. Asumiendo que tales infecciones congénitas resultaron de la reactivación materna de una variante antigénica menor que ya reside en la madre, el hecho de que la infección congénita todavía ocurriera indica la propagación de una variante dentro de una madre que posee una amplia inmunidad antiviral desde el(los) sitio(s) de reactivación hasta la interfaz materno-fetal. Independientemente de si las infecciones congénitas en mujeres inmunes resultan de la reinfección y/o reactivación, la pregunta central sigue siendo la misma. ¿Cómo puede HCMV diseminarse sistémicamente dentro de un individuo que tiene amplias y robustas especificidades para neutralizar e inmunógenos celulares? Sin lugar a dudas, el HCMV ha evolucionado funcionalidades redundantes, superpuestas e independientes dentro de su proteoma para permitir su diseminación altamente eficiente a los huéspedes vírgenes e inmunes. Durante la reinfección, las células T efectoras residentes, que se enriquecen en las superficies mucosas, deben responder rápidamente a los antígenos virales y aclarar las células infectadas viralmente. Sin embargo, la evidencia acumulada demuestra que existe una conspiración de proteínas virales que subyugan las células T efectoras/de memoria CD4⁺ y CD8⁺ y las células dendríticas residentes (DC).

Los estudios de HCMV y MCMV demuestran que la señalización a través de IL-10R mediante cmvIL-10 o cIL-10 murina, respectivamente, interfiere en el reconocimiento por las CD4⁺ de las células infectadas (HCMV) y la diferenciación de las células T efectoras CD4⁺ (MCMV) (3,126). Un estudio mediante el uso de un RhCMV recombinante con los genes virales eliminados que codifica para proteínas que interfieren en la presentación de antígeno por el MHC clase I mostró que, mientras que estas proteínas fueron prescindibles para el establecimiento de una infección primaria, fueron esenciales para la reinfección de un huésped inmune (127). La supresión inmune por cmvIL-10 de DC residentes debe inhibir la activación de las células T de memoria específicas para HCMV (43). En breve, HCMV ha evolucionado la capacidad para atenuar casi entero el repertorio inmunitario innato y adaptivo, que pudiera contar para la alta eficiencia de HCMV en la diseminación a través de poblaciones inmunes y no inmunes. Estos estudios examinan las contribuciones de rhcmvIL-10 a la capacidad de RhCMV de reinfectar un huésped inmune al analizar la eficiencia de reinfección en huéspedes que difieren en sus títulos de NAb contra rhcmvIL-10. Mediante el uso de variantes antigénicamente etiquetadas de RhCMV, los monos infectados con RhCMV pueden inocularse S.C. con tan solo 100 PFU y desarrollar respuestas de células T a los antígenos SIV expresados en el contexto de la expresión de RhCMV (127). Estos estudios midieron el desarrollo de *novode* respuestas inmunitarias a sucesivas con variantes diferentes de RhCMV que expresan antígenos SIV diferentes y muestran que los virus recombinantes pueden detectarse en la orina de los animales superinfectados. Estos estudios se basaron en una cepa de RhCMV (68-1), que no codifica el complejo de proteínas virales esenciales para el tropismo epitelial (UL128/UL130/UL131A), y tres marco abierto de lecturas (ORF) similar a alfa quimiocina (128). RhCMV 68-1 no expresa rhcmvIL-10. El complejo UL128 y/o el ORF similar a α -quimiocina son esenciales para los niveles altos de eliminación persistente en animales inoculados (113). La presencia del ADN de RhCMV 68-1 en fluidos corporales se atenúa profundamente en comparación con cepas de RhCMV tipo silvestre (UCD59).

Los monos no infectados con RhCMV se inocularán (400 PFU) con una variante de RhCMV 68-1 en la cual el gen de rhcmvIL-10 (UL111A) se ha eliminado (RhCMV Δ UL111A) (114). La inoculación de monos vírgenes con este título bajo de RhCMV Δ UL111A resulta en el 100 % de infección según se midió por la generación de respuestas inmunitarias antivirales persistentes. Como el RhCMV 68-1 parental, RhCMV Δ UL111A exhibe eliminación atenuada severamente. Los animales inoculados con RhCMV Δ UL111A se estratificarán por títulos de NAb contra RhCMV a las 12 semanas después de la inoculación para generar dos grupos con intervalos comparables en títulos de NAb contra RhCMV. Una mitad de los animales se inmunizará con rhcmvIL-10 M1/M2 a las 12, 18, y 24 semanas, y la otra mitad de los animales se inmunizará con control proteína. Los animales se inocularán después oralmente (PO) con el título mínimo de RhCMV UCD59 que resulta en el 100 % de la eliminación después de la reinfección en animales inoculados con RhCMV Δ UL111A (descrito a continuación). La ruta oral de desafío con RhCMV UCD59 se usará dado que refleja mejor el modo transmucosal de adquisición de HCMV transmitido horizontalmente por mujeres embarazadas. Los monos no infectados pueden infectarse oralmente con RhCMV 68-1 (119). La frecuencia y magnitud de la eliminación se compararán con los animales inmunizados con proteína control para determinar si la inmunización contra rhcmvIL-10 confiere resistencia aumentada a la reinfección.

Animales e inmunización con rhcmvIL-10

Veinte macacos (~1 año de edad) confirmados repetidamente ser seronegativos para la infección por RhCMV se usarán para este estudio (Años 4 y 5). Los animales se inocularán con RhCMV Δ UL111A (400 PFU, subcutáneo) (114). La sangre, saliva, y orina se analizarán prospectivamente a lo largo de las 26 semanas después de la inoculación. Los animales se estratificarán para NAb contra RhCMV a la semana 10 de manera que exista una distribución igual para los grupos vacuna (rhcmvIL-10) y controles (influenza). Una mitad de los animales se inmunizarán en la semana 12 con rhcmvIL-10 M1/M2, como se describe en el Objetivo 1, y se reforzarán en las semanas 18 y 24. Los otros animales se inmunizarán contra los antígenos de influenza, como se describe en el Objetivo 1.

Reinfección por RhCMV UCD59

Los animales se desafiarán PO a la semana 26 con RhCMV UCD59. El título del virus se determinará por un estudio en el cual los animales inoculados primero con RhCMV Δ UL111A se reinfectan con incrementos seriados de 10 veces en el título de UCD59. En resumen, macacos seronegativos (N=12) se inocularán con Δ UL111A como se describe a continuación. A partir de la semana 18, cuando las respuestas inmunitarias antivirales se han estabilizado en su mayoría,

los grupos de animales se inocularán con UCD59 a títulos que van desde 10^3 - 10^6 (N = 3 por 10 veces de aumento en el título) (119). Los animales se evaluarán prospectivamente para determinar la eliminación de UCD59 en saliva y orina. Basado en el estudio previo, sólo UCD59 debe detectarse en fluidos corporales por ensayos basados en PCR, que se confirmará por PCR diferencial (113). El título mínimo que resulta en el 100 % de eliminación se usará para reinfectar los animales inmunizados contra rhcmvIL-10 o influenza. Las muestras se colectarán, y los parámetros inmunológicos y virológicos de las reinfección con UCD59 se analizarán como se describe en la presente descripción. El criterio principal que se evaluará es si la inmunización previa con rhcmvIL-10 M1 / M2 estimula una reducción biológicamente relevante en la eliminación de UCD59, aunque las contribuciones de las variables independientes se analizarán estadísticamente.

Un principio central de este enfoque es que la inmunización contra rhcmvIL-10 aumentará los NAb en la mucosa y la submucosa para lograr la máxima eficacia protectora contra la reinfección del virus de desafío. Los animales no infectados inmunizados contra rhcmvIL-10 M1/M2 (Figura 13) fueron positivos para IgG contra rhcmvIL-10 en la saliva el día del desafío, lo que demuestra que la inmunización sistémica logra una medida de inmunidad protectora en la superficie mucosa. Además, una biopsia de uno de los sitios de inoculación de desafío S.C. mostró diferencias demostrables de las biopsias de los animales controles. Mientras que la inoculación de animales vírgenes con UCD59 estimula un infiltrado linfocítico mixto que consiste en células mononucleares y neutrófilos a los 7 días después de la inoculación, las biopsias de animales inmunizados fueron notables por una reducción en los neutrófilos y un predominio de células mononucleares. La interpretación es la respuesta inmunitaria efectora estimulada por inmunización que podría localizarse rápidamente en el sitio de los antígenos virales, lo que conduce a reducciones significativas en la eliminación en saliva. (Figura 13). Basado en estos resultados después de la inoculación S.C., es altamente probable que las células efectoras se alojen de manera similar en la mucosa oral después del desafío oral con RhCMV.

Caracterización de las alteraciones inducidas por rhcmvIL-10 a la inmunidad anti-RhCMV del huésped

La inmunización de macacos vírgenes con rhcmvIL-10 M1/M2 (i) estimula los anticuerpos que neutralizan la funcionalidad de rhcmvIL-10 WT, y (ii) disminuye la frecuencia de detección y el nivel de replicación de RhCMV en animales desafiados con RhCMV (Figura 13). Estos hallazgos implican que los anticuerpos contra rhcmvIL-10 solos alteran suficientemente la respuesta del huésped contra RhCMV durante la infección primaria, lo que resulta en un mayor control de la replicación del virus de desafío y la diseminación dentro del huésped. Hay corolarios no exclusivos de este postulado con importantes ramificaciones clínicas para las vacunas preventivas y terapéuticas. Un corolario es que, en la ausencia mediada por la vacuna de rhcmvIL-10 funcional, existe un mayor potencial para desarrollar respuestas antivirales del huésped *de novo* a otros antígenos virales después del desafío primario que limitará más eficientemente la excreción del virus. La base para esto se deriva de un estudio que compara las respuestas inmunes antivirales en animales no inmunizados inoculados con RhCMV 68-1 (que expresa rhcmvIL-10) o con una variante en la que se ha eliminado el gen de rhcmvIL-10 (UL111A) (Δ UL111A) (114). Los monos inoculados con Δ UL111A desarrollan títulos de IgG más altos para los antígenos de RhCMV, mayor avidez del anticuerpo y respuestas de células T mejoradas que los inoculados con el progenitor 68-1 (no se muestra). Un segundo corolario es que la inmunización con rhcmvIL-10 en animales infectados persistentemente puede aumentar la amplitud y la magnitud de las especificidades inmunitarias existentes. Los estudios de infección por LCMV en ratones muestran que "las células T disfuncionales pueden reactivarse funcionalmente durante la infección persistente" (36). Además, hay un notable sesgo de las respuestas inmunitarias celulares a los antígenos de HCMV, lo que implica que la generación de respuestas a antígenos adicionales es posible. Las células T específicas para HCMV se dirigen primariamente a proteínas estructurales víricas, tegumentales e inmediatas tempranas con casi no reactividad a las proteínas involucradas en el metabolismo y la replicación del ADN (74). Si la inmunización con cmvIL-10, ya sea en el contexto de prevenir la infección primaria o modificar una infección existente, aumenta la inmunidad protectora contra otros antígenos virales, los resultados relevantes deben incluir la limitación de la diseminación horizontal a las cohortes y la diseminación vertical al feto.

Estos estudios se dirigen a definir cambios diferenciales en la cinética, la magnitud y la especificidad de las respuestas de anticuerpos a otros antígenos de RhCMV que modifican el patrón de la replicación viral en monos inmunizados. Las cuestiones específicas incluyen la cuantificación de (i) NAb para virus en plasma y saliva, (ii) la frecuencia de los plasmablastos que secretan Ab antivirales; y la caracterización de (iii) la reactividad específica del Ab anti-envoltura, y (iv) la maduración por afinidad de los anticuerpos específicos de RhCMV. cmvIL-10, como cIL-10, es funcionalmente pleiotrópico hacia múltiples tipos de células que tienen IL-10R, incluidas las células T. La anulación del acoplamiento de rhcmvIL-10 a IL-10R por la inmunización podría tener efectos importantes sobre la función y regulación de las células T. Las respuestas celulares inmunitarias se analizarán en los diferentes grupos de tratamiento para determinar si hay cambios en la especificidad y la magnitud de las respuestas específicas para RhCMV. Además, los cambios en las células T reguladoras (Treg) se caracterizarán, ya que estas células son críticas para mantener un equilibrio homeostático entre la inflamación y la función efectora de las células T, lo que potencialmente "afecta el aclaramiento de patógenos" (129). Los estudios han demostrado que la exposición de DC derivadas de monocitos a IL-10 y TGF- β genera un fenotipo tolerogénico en estas células que a su vez induce un estado de anergia en las células T específicas de antígeno y el desarrollo de un fenotipo de célula T reguladora (130). Se ha mostrado que la infección por HCMV de células epiteliales estimula la expresión de TGF- β 1 (131), lo que sugiere una base sinérgica por la cual cmvIL-10 y TGF- β 1 podrían inducir células T disfuncionales. La dramática reducción de la eliminación viral después de la inmunización con rhcmvIL-10 y el desafío con RhCMV (Figura 13) demuestra que esta es una estrategia de vacuna viable. Sin embargo, la ausencia de títulos aumentados de NAb contra rhcmvIL-10 en el 20 % de los animales inmunizados indica que se justifica una optimización adicional del inmunógeno rhcmvIL-10. Con ese fin, se definirá la especificidad del epítipo de Nab para

rhcmvIL-10 para optimizar el diseño del antígeno. Los resultados tienen un amplio potencial clínico para maximizar la utilidad de los inmunógenos apropiados para estimular NAb contra diferentes cepas de HCMV, y también para explorar el uso de anticuerpos monoclonales (MAb) modificados genéticamente como terapias clínicas para las infecciones congénitas y de receptores de trasplantes.

Cuantificación de las respuestas de NAb contra RhCMV

Los títulos de NAb contra virus se titularán en los diferentes grupos de tratamiento mediante microneutralización para la reducción del 50 % en la infectividad del virus de entrada tanto en fibroblastos de rhesus como en células epiteliales mediante el uso de las cepas 68-1/EGFP y UCD59 de RhCMV, respectivamente (113,123). También se analizarán las cinéticas temporales de las respuestas NAb de novo después del desafío primario con RhCMV en animales vírgenes inmunizados con rhcmvIL-10 M1/M2 o controles (Figura 13). Los NAb de plasma se postulan para limitar la diseminación sistémica de RhCMV (103). Se cree que el Ab antiviral presente en los fluidos de la mucosa, tal como la saliva, limita la replicación viral local al limitar la diseminación en la mucosa y la submucosa y, de manera secundaria limita, la excreción del virus en la saliva. El Ab de mucosa se deriva principalmente por transudación de IgG sérica, aunque se han presentado pruebas consistentes con la síntesis local de IgG en la cavidad oral (133,134). Los títulos de NAb en plasma probablemente reflejarán los de la saliva, aunque los NAb en saliva se cuantificarán en los diferentes grupos de tratamiento.

Cuantificación de las respuestas de los blastos en plasma

Para cuantificar aún más la modulación de la respuesta del anticuerpo a RhCMV en animales inmunizados con rhcmvIL-10, la frecuencia de plasmablastos con RhCMV en diferentes grupos de tratamiento se determinará mediante el uso de un ensayo ELISPOT modificado. En resumen, los pocillos de una placa de 96 pocillos se recubren con IgG anti-rhesus o RhCMV purificado, para cuantificar la IgG total y la IgG específica de RhCMV, respectivamente, similar a la descrita por Wrammert, y otros (135). Las células secretoras de IgG y RhCMV se detectarán con IgG anti-rhesus biotinilada seguida por avidina-AEC y se cuantificarán como el número de células secretoras de anticuerpos por 10^6 PBMC. La cuantificación de los plasmablastos se coordinará con los ensayos celulares que miden las respuestas de las células T.

Caracterización de la reactividad específica de Ab anti-envoltura

Basado en estudios en HCMV, MCMV, CMV de cobaya y RhCMV, los NAb contra virus se dirigen a proteínas de la envoltura viral (75,79,136-144). Se determinará la reactividad de los anticuerpos contra RhCMV para proteínas conocidas de la envoltura de RhCMV, que incluyen gB, gH, gL y el complejo UL128/131a/130. Estos ensayos aprovecharán los constructos de Ankara (MVA) de vacuna modificada que expresan individualmente estos ORF. Las células BHK infectadas con MVA de control o que expresa antígenos se usarán como fuente de antígeno para su uso en los ensayos de unión de anticuerpos en plasma de los diferentes grupos de tratamiento, similares a los estudios de reactividad de Ab contra HCMV (139). Además, se investigará la posibilidad de que la inmunización con rhcmvIL-10 conduzca a un aumento en la amplitud de las respuestas de Ab, incluidas aquellas para proteínas de la envoltura que pueden ser dianas no reconocidas de Ab antiviral. Se usarán dos fuentes de envoltura de RhCMV etiquetada derivadas de viriones purificados en gradiente. El enfoque inicial usará proteínas de la envoltura biotinilada, precipitación con perlas de avidina, seguido de SDS-PAGE e inmunotransferencia con suero de rhesus. Alternativamente, los viriones de RhCMV marcados con I¹²⁵ se precipitarán inmunes con anticuerpos IgG en plasma y se resolverán mediante SDS-PAGE (141,145). En cualquiera de los enfoques, las proteínas se identificarán por el peso molecular. Si se definen nuevas reactividades de anticuerpos para proteínas distintas de las proteínas de la envoltura conocidas utilizadas en los ensayos de unión descritos anteriormente, las proteínas se aislarán de los geles de SDS-PAGE o de las membranas apropiadas y se analizarán mediante espectroscopía de masas.

Determinación de la maduración de la afinidad del Ab específico para RhCMV

En estudios iniciales, se usarán viriones de RhCMV purificados en gradiente en un ensayo de unión en fase sólida para determinar la maduración de la afinidad de los anticuerpos IgG anti-envoltura en animales inmunizados con rhcmvIL-10 y controles mediante el uso de metodologías similares a los estudios en HCMV (146). Este ensayo determinará si los animales inmunizados con rhcmvIL-10 aceleran el desarrollo de anticuerpos de alta afinidad, en comparación con los animales de control. La afinidad de los anticuerpos IgG de la saliva presentes en los animales inmunizados con rhcmvIL-10 y de control también se analizará (Figura 20). Finalmente, se usará una modificación de este ensayo para investigar la maduración de la afinidad de los anticuerpos de plasma reactivos con las proteínas de envoltura individuales seleccionadas (146). Los resultados de esta serie de experimentos permitirán la identificación de diferencias en la maduración de la afinidad en los anticuerpos anti-envoltura generados por animales inmunizados con rhcmvIL-10 y animales de control.

Alteraciones en CMI

Las respuestas inmunitarias celulares a los antígenos de rhcmvIL-10 y RhCMV se examinarán en PBMC de animales en los diferentes grupos de tratamiento (Figura 13) mediante tinción de citoquinas intracelulares multiparamétrica (ICS) (103,116). El análisis fenotípico y funcional determinará las frecuencias de células T vírgenes (CD28⁺CD45RA⁺), centrales

(CD28⁺CCR7⁺), efectoras transicionales (CD28⁺CCR7⁻), y efectoras de memoria (CD28⁻CCR7⁻) (CD4 y CD8), y su capacidad para producir citocinas (IFN- γ , TNF- α , y IL-2) y el marcador de desgranulación CD107a después de la estimulación con antígeno. Los antígenos de RhCMV para los ensayos de ICS incluirán lisado de RhCMV, rhcmvIL-10 M1/M2 y conjuntos de péptidos superpuestos para las proteínas de RhCMV pp65-2 y pp28. Mientras que pp65 es inmunogénico en monos infectados con RhCMV (147), la reactividad a pp28 es mínimamente inmunogénica. Por lo tanto, pp28 servirá como marcador para la adquisición de reactividad inmune *de novo* en ausencia de rhcmvIL-10 funcional. Las frecuencias relativas de Treg en sangre periférica se analizarán mediante citometría de flujo mediante el uso de CD127^{bajo} CD25^{alto} y Foxp3 intracelular como marcadores. La activación inmune se analizará para determinar las frecuencias de las células T CD4 y CD8 que expresan CCR5, CXCR3, CD69 y Ki67. Todos los estudios usarán MAb que reaccionan de forma cruzada con los epítomos de rhesus (Recurso de Reactivos de Primates No Humanos NIH).

Identificación de epítomos neutralizantes en rhcmvIL-10

La generación de MAb de macaco para rhcmvIL-10 seguirá los procedimientos establecidos para otros antígenos, incluidos el HCMV, SIV y la influenza (135,148-151). Los plasmablastos se distribuyen de las células vivas por la selección inicial de CD19⁺/CD20^{bajo}/CD3⁻, seguido por la selección de IgG⁺/CD38^{alto}/CD27^{alto}. Las células únicas se distribuyen en cada pocillo de una placa de 96 pocillos para el aislamiento de ARN. Se usarán PBMC de un subconjunto de los diferentes grupos de tratamiento y animales inmunizados (Figura 13), basados principalmente en la magnitud de los NAb contra rhcmvIL-10. También se incluirán los animales inmunizados que desarrollaron respuestas de unión pero no de NAb contra rhcmvIL-10. El ARN se aislará de cada pocillo y se usará para el PCR de transcripción inversa para amplificar los genes de las regiones variables de la cadena pesada (H) y ligera (L) (κ y λ) mediante el uso de pares de cebadores específicos de rhesus descritos por Kuwata y otros. (149) Los amplicones de VDJ (H) y VJ (L) se verificarán mediante secuenciación, y los clones apropiados se volverán a amplificar con cebadores que contienen sitios de restricción para la clonación en vectores de expresión que contienen las regiones constantes para IgG1, Igk e Ig λ humanas (152). Las células HEK293 se transfectarán con los vectores de la cadena H y L. El Ab recombinante en los sobrenadantes de células transfectadas se purificará con sefarsa de proteína A y se analizará su reactividad a rhcmvIL-10 y antígenos de RhCMV mediante ELISA.

Para optimizar el diseño del inmunógeno, las características de una respuesta inmunitaria efectiva e inefectiva a los antígenos actuales de rhcmvIL-10 deben definirse a nivel molecular. Se caracterizarán aproximadamente 25 Ab, cada uno obtenido de animales que exhiben altos títulos de NAb (inmunizados e infectados naturalmente) contra aquellos que producen Ab que se unen a rhcmvIL-10, pero no neutralizan la bioactividad. El análisis de secuencia proporcionará una estimación inicial de la diversidad de Ab generados durante la inmunización e infección. Las cadenas H y L de los Ab se expresarán conjuntamente en un vector de expresión de un solo promotor dual en células HEK293 para aumentar los rendimientos de Ab para la caracterización biofísica. La afinidad de los Ab por rhcmvIL10 se determinará mediante el uso de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Se espera que la afinidad de Ab para rhcmvIL-10 esté relacionada con la efectividad de la respuesta inmunitaria. En segundo lugar, los epítomos de unión a Ab se mapearán utilizando SPR. Estos experimentos permitirán que los Ab se agrupen en clases que reconozcan regiones similares de rhcmvIL-10. La función de cada Ab se caracterizará entonces en un ensayo de neutralización *in vitro* de rhcmvIL-10. Finalmente, los contactos detallados de los grupos de epítomos se determinarán mediante cristalografía de rayos X. Esto se logrará al preparar Fab de cada Ab y cristalizándolos con rhcmvIL-10 como se realizó previamente con cmvIL-10 (48). La comprensión de estos contactos, junto con los otros parámetros descritos anteriormente, permitirá determinar qué epítomos específicos son más efectivos en la neutralización de rhcmvIL-10. Estos datos permitirán la optimización racional de los inmunógenos mutantes de rhcmvIL-10 para estimular títulos más altos de NAb contra rhcmvIL-10.

El aislamiento de MAb específico para rhcmvIL-10 depende de la presencia de un número suficiente de plasmablastos circulantes para facilitar el aislamiento eficiente de clones específicos de cadenas H y L ¹⁵⁰. Las células B se aislarán en los tiempos picos de la respuesta de Ab mediada por la vacuna para maximizar el potencial de aislamiento de clones específicos de rhcmvIL-10. Si es necesario, se usará la inmortalización de células B con EBV (153), si los clones específicos de rhcmvIL-10 no se aíslan fácilmente según la metodología propuesta. El enfoque general de estos estudios permite obtener nuevos conocimientos sobre la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped por parte de HCMV y una base racional para una amplia expansión de las poblaciones objetivo de la vacuna HCMV actual.

Referencias para el Ejemplo 5

1. Campbell, A.E., Cavanaugh, V.J. & Slater, J.S. The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence. *Med Microbiol Immunol* 197, 205-213 (2008).
2. Chang, W. & Barry, P. Attenuation of innate immunity by cytomegalovirus IL-10 establishes a long-term deficit of adaptive antiviral immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* in press (2011).
3. Humphreys, I.R., de Trez, C., Kinkade, A., Benedict, C.A., Croft, M. & Ware, C.F. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *The Journal of experimental medicine* 204, 1217-1225 (2007).
4. Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B. & Oldstone, M.B. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature medicine* 12, 1301-1309 (2006).
5. Brooks, D.G., Walsh, K.B., Elsaesser, H. & Oldstone, M.B. IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3018-3023 (2010).

6. Brooks, D.G., Lee, A.M., Elsaesser, H., McGavern, D.B. & Oldstone, M.B. IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *The Journal of experimental medicine* 205, 533-541 (2008).
7. Sierra, B., Perez, A.B., Vogt, K., Garcia, G., Schmolke, K., Aguirre, E., Alvarez, M., Kern, F., Kouri, G., Volk, H.D. & Guzman, M.G. Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? *Cell Immunol* 262, 134-140 (2010).
8. Ubol, S., Phuklia, W., Kalayanaroj, S. & Modhiran, N. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J. Infect. Dis.* 201, 923-935 (2010).
9. Alter, G., Kavanagh, D., Rihn, S., Luteijn, R., Brooks, D., Oldstone, M., van Lunzen, J. & Altfield, M. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *The Journal of clinical investigation* 120, 1905-1913 (2010).
10. Song, W., Li, Y., Wilson, C. & Tang, J. Identification of Three Immunologic Correlates for HIV Type 1 Pathogenesis in Youth. *AIDS research and human retroviruses* in press (2010).
11. Bolpetti, A., Silva, J.S., Villa, L.L. & Lepique, A.P. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol* 11, 27 (2010).
12. Welters, M.J., Kenter, G.G., de Vos van Steenwijk, P.J., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Essahsah, F., Stynenbosch, L.F., Vloon, A.P., Ramwadhoebe, T.H., Piersma, S.J., van der Hulst, J.M., Valentijn, A.R., Fathors, L.M., Drijfhout, J.W., Franken, K.L., Oostendorp, J., Fleuren, G.J., Melief, C.J. & van der Burg, S.H. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11895-11899.
13. Barboza, L., Salmen, S., Peterson, D.L., Montes, H., Colmenares, M., Hernandez, M., Berrueta-Carrillo, L.E. & Berrueta, L. Altered T cell costimulation during chronic hepatitis B infection. *Cell Immunol* 257, 61-68 (2009).
14. Flynn, J.K., Dore, G.J., Hellard, M., Yeung, B., Rawlinson, W.D., White, P.A., Kaldor, J.M., Lloyd, A.R. & French, R.A. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users. *J Viral Hepat* in press (2010).
15. Kaplan, D.E., Ikeda, F., Li, Y., Nakamoto, N., Ganesan, S., Valiga, M.E., Nunes, F.A., Rajender Reddy, K. & Chang, K.M. Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. *J Hepatol* 48, 903-913 (2008).
16. Langhans, B., Braunschweiler, I., Arndt, S., Schulte, W., Satoguina, J., Layland, L.E., Vidovic, N., Hoerauf, A., Oldenburg, J., Sauerbruch, T. & Spengler, U. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 119, 97-109 (2010).
17. Li, J., Wu, W., Peng, G., Chen, F., Bai, M., Zheng, M. & Chen, Z. HBcAg induces interleukin-10 production, inhibiting HBcAg-specific Th17 responses in chronic hepatitis B patients. *Immunol Cell Biol* in press (2010).
18. de la Barrera, S., Aleman, M., Musella, R., Schierloh, P., Pasquinelli, V., Garcia, V., Abbate, E. & Sasiain Mdel, C. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 138, 128-138 (2004).
19. Ho, J.L. & Lapa e Silva, J.R. Promotion of a down-modulated lung immune state may be a strategy by M. tuberculosis to foster active disease and persistence. *Discov Med* 9, 34-41 (2010).
20. Marks, E., Tam, M.A. & Lycke, N.Y. The Female Lower Genital Tract Is a Privileged Compartment with IL-10 Producing Dendritic Cells and Poor Th1 Immunity following Chlamydia Trachomatis Infection. *PLoS pathogens* 6, e1001179 (2010).
21. Bahjat, K.S., Meyer-Morse, N., Lemmens, E.E., Shugart, J.A., Dubensky, T.W., Brockstedt, D.G. & Portnoy, D.A. Suppression of cell-mediated immunity following recognition of phagosome-confined bacteria. *PLoS pathogens* 5, e1000568 (2009).
22. Biswas, P.S., Pedicord, V., Ploss, A., Menet, E., Leiner, I. & Pamer, E.G. Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10. *J. Immunol.* 179, 4520-4528 (2007).
23. Peters, N. & Sacks, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213, 159-179 (2006).
24. Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K. & Reiner, N.E. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 185, 5011-5022 (2010).
25. Bueno, L.L., Morais, C.G., Araujo, F.F., Gomes, J.A., Correa-Oliveira, R., Soares, I.S., Lacerda, M.V., Fujiwara, R.T. & Braga, E.M. Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS ONE* 5, e9623 (2010).
26. Ferreira, M.C., de Oliveira, R.T., da Silva, R.M., Blotta, M.H. & Mamoni, R.L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 78, 4392-4401 (2010).
27. Moreira, A.P., Dias-Melicio, L.A. & Soares, A.M. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages Paracoccidioides brasiliensis killing: effect on H2O2 and NO production. *Cell Immunol* 263, 196-203 (2010).
28. Wilson, E.B. & Brooks, D.G. The Role of IL-10 in Regulating Immunity to Persistent Viral Infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* in press (2010).
29. D'Orazio, T.J. & Niederkorn, J.Y. A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J. Immunol.* 160, 2089-2098 (1998).
30. Skelsey, M.E., Mayhew, E. & Niederkorn, J.Y. CD25+, interleukin-10-producing CD4+ T cells are required for suppressor cell production and immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunology* 110, 18-29 (2003).
31. Szajnik, M., Czysowska, M., Szczepanski, M.J., Mandapathil, M. & Whiteside, T.L. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS ONE* 5, e11469 (2010).

32. Wilczynski, J.R., Radwan, M. & Kalinka, J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci* 13, 2266-2274 (2008).
33. Suter, T., Biollaz, G., Gatto, D., Bernasconi, L., Herren, T., Reith, W. & Fontana, A. The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol* 33, 2998-3006 (2003).
- 5 34. Slobedman, B., Barry, P.A., Spencer, J.V., Avdic, S. & Abendroth, A. Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J. Virol.* 83, 9618-9629 (2009).
35. Ha, S.J., West, E.E., Araki, K., Smith, K.A. & Ahmed, R. Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune system towards the success of therapeutic vaccination against chronic viral infections. *Immunol Rev* 223, 317-333 (2008).
36. Brooks, D.G., McGavern, D.B. & Oldstone, M.B. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *The Journal of clinical investigation* 116, 1675-1685 (2006).
- 10 37. Redpath, S., Angulo, A., Gascoigne, N.R. & Ghazal, P. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.* 162, 6701-6707 (1999).
38. Cheeran, M.C., Hu, S., Palmquist, J.M., Bakken, T., Gekker, G. & Lokensgard, J.R. Dysregulated interferon-gamma responses during lethal cytomegalovirus brain infection of IL-10-deficient mice. *Virus Res* 130, 96-102 (2007).
- 15 39. Oakley, O.R., Garvy, B.A., Humphreys, S., Qureshi, M.H. & Pomeroy, C. Increased weight loss with reduced viral replication in interleukin-10 knock-out mice infected with murine cytomegalovirus. *Clin Exp Immunol* 151, 155-164 (2008).
40. Jones, M., Ladell, K., Wynn, K.K., Stacey, M.A., Quigley, M.F., Gostick, E., Price, D.A. & Humphreys, I.R. IL-10 restricts memory T cell inflation during cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 185, 3583-3592 (2010).
41. Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J. & Hayward, G.S. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 84, 17-28 (2003).
- 20 42. Lockridge, K.M., Zhou, S.S., Kravitz, R.H., Johnson, J.L., Sawai, E.T., Blewett, E.L. & Barry, P.A. Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virol* 268, 272-280 (2000).
43. Chang, W.L., Baumgarth, N., Eberhardt, M.K., Lee, C.Y., Baron, C.A., Gregg, J.P. & Barry, P.A. Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous or endogenous IL-10 during maturation determines their longevity. *J. Immunol.* 178, 7794-7804 (2007).
- 25 44. Chang, W.L., Baumgarth, N., Yu, D. & Barry, P.A. Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J. Virol.* 78, 8720-8731 (2004).
45. Raftery, M.J., Wieland, D., Gronewald, S., Kraus, A.A., Giese, T. & Schonrich, G. Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J. Immunol.* 173, 3383-3391 (2004).
- 30 46. Spencer, J.V., Cadaoas, J., Castillo, P.R., Saini, V. & Slobedman, B. Stimulation of B lymphocytes by cmvIL-10 but not LAcmvIL-10. *Virol* 374, 164-169 (2008).
47. Spencer, J.V., Lockridge, K.M., Barry, P.A., Lin, G., Tsang, M., Penfold, M.E. & Schall, T.J. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus- encoded interleukin-10. *J. Virol.* 76, 1285-1292. (2002).
- 35 48. Jones, B.C., Logsdon, N.J., Josephson, K., Cook, J., Barry, P.A. & Walter, M.R. Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9404-9409 (2002).
49. Sohn, Y.M., Park, K.I., Lee, C., Han, D.G. & Lee, W.Y. Congenital cytomegalovirus infection in Korean population with very high prevalence of maternal immunity. *J Korean Med Sci* 7, 47-51 (1992).
- 40 50. Boppana, S.B., Rivera, L.B., Fowler, K.B., Mach, M. & Britt, W.J. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *The New England journal of medicine* 344, 1366-1371 (2001).
51. Gaytant, M.A., Rours, G.I., Steegers, E.A., Galama, J.M. & Semmekrot, B.A. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr* 162, 248-253 (2003).
52. Gaytant, M.A., Steegers, E.A., Semmekrot, B.A., Merkus, H.M. & Galama, J.M. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv* 57, 245-256 (2002).
- 45 53. Gandhoke, I., Aggarwal, R., Lal, S. & Khare, S. Congenital CMV infection in symptomatic infants in Delhi and surrounding areas. *Indian J Pediatr* 73, 1095-1097 (2006).
54. Ross, S.A., Arora, N., Novak, Z., Fowler, K.B., Britt, W.J. & Boppana, S.B. Cytomegalovirus reinfections in healthy seroimmune women. *J. Infect. Dis.* 201, 386-389 (2010).
- 50 55. Yamamoto, A.Y., Mussi-Pinhata, M.M., Boppana, S.B., Novak, Z., Wagatsuma, V.M., Oliveira Pde, F., Duarte, G. & Britt, W.J. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol* 202, 297 e291-298 (2010).
56. Ross, S.A., Fowler, K.B., Ashrith, G., Stagno, S., Britt, W.J., Pass, R.F. & Boppana, S.B. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr* 148, 332-336 (2006).
- 55 57. Wang, C., Zhang, X., Bialek, S. & Cannon, M.J. Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. *Clin Infect Dis* 52, e11-13 (2011).
58. Colugnati, F.A., Staras, S.A., Dollard, S.C. & Cannon, M.J. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. *BMC Infect Dis* 7, 71 (2007).
59. Fowler, K.B. & Pass, R.F. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics* 118, e286-292 (2006).
- 60 60. Marshall, B.C. & Adler, S.P. The frequency of pregnancy and exposure to cytomegalovirus infections among women with a young child in day care. *Am J Obstet Gynecol* (2008).
61. Noyola, D.E., Valdez-Lopez, B.H., Hernandez-Salinas, A.E., Santos-Diaz, M.A., Noyola-Frias, M.A., Reyes-Macias, J.F. & Martinez-Martinez, L.G. Cytomegalovirus excretion in children attending day-care centers. *Arch Med Res* 36, 590-593 (2005).
- 65

62. Staras, S.A., Flanders, W.D., Dollard, S.C., Pass, R.F., McGowan, J.E., Jr. & Cannon, M.J. Cytomegalovirus seroprevalence and childhood sources of infection: A population-based study among pre-adolescents in the United States. *J Clin Virol* 43, 266-271 (2008).
63. Hyde, T.B., Schmid, D.S. & Cannon, M.J. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol* 20, 311-326 (2010).
64. Hamprecht, K., Vochem, M., Baumeister, A., Boniek, M., Speer, C.P. & Jahn, G. Detection of cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR. *Virol Meth* 70, 167-176 (1998).
65. Schleiss, M.R. Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection: recent advances. *Current opinion in pediatrics* 18, 48-52 (2006).
66. Britt, W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 417-470 (2008).
67. Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R.F. & Alford, C. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 72, 295-299 (1983).
68. Gautheret-Dejean, A., Aubin, J.T., Poirel, L., Huraux, J.M., Nicolas, J.C., Rozenbaum, W. & Agut, H. Detection of human Betaherpesvirinae in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *J Clin Microbiol* 35, 1600-1603. (1997).
69. Howard, M.R., Whitby, D., Bahadur, G., Suggett, F., Boshoff, C., Tenant-Flowers, M., Schulz, T.F., Kirk, S., Matthews, S., Weller, I.V., Tedder, R.S. & Weiss, R.A. Detection of human herpesvirus 8 DNA in semen from HIV-infected individuals but not healthy semen donors. *AIDS (London, England)* 11, F15-19. (1997).
70. Kashiwagi, Y., Nemoto, S., Hisashi, Kawashima, Takekuma, K., Matsuno, T., Hoshika, A. & Nozaki-Renard, J. Cytomegalovirus DNA among children attending two day-care centers in Tokyo. *Pediatr Int* 43, 493-495. (2001).
71. Mansat, A., Mengelle, C., Chalet, M., Boumzebra, A., Miousset, R., Puel, J., Prouheze, C. & Segondy, M. Cytomegalovirus detection in cryopreserved semen samples collected for therapeutic donor insemination. *Hum Reprod* 12, 1663-1666. (1997).
72. Stagno, S., Reynolds, D., Tsiantos, A., Fuccillo, D.A., Smith, R., Tiller, M. & Alford, C.A., Jr. Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women: suppression in early gestation. *J. Infect. Dis.* 131, 522-527. (1975).
73. Arora, N., Novak, Z., Fowler, K.B., Boppana, S.B. & Ross, S.A. Cytomegalovirus Viruria and DNAemia in Healthy Seropositive Women. *J. Infect. Dis.* in press (2010).
74. Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., Nelson, J.A. & Picker, L.J. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine* 202, 673-685 (2005).
75. Britt, W.J. & Mach, M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 39, 401-412 (1996).
76. Revello, M.G. & Gerna, G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev Med Virol* 20, 136-155 (2010).
77. Cui, X., Meza, B.P., Adler, S.P. & McVoy, M.A. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine* 26, 5760-5766 (2008).
78. Macagno, A., Bernasconi, N.L., Vanzetta, F., Dander, E., Sarasini, A., Revello, M.G., Gerna, G., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J. Virol.* 84, 1005-1013 (2009).
79. Britt, W.J. Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virol* 135, 369-378 (1984).
80. Chang, W.L., Barry, P.A., Szubin, R., Wang, D. & Baumgarth, N. Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog. *Virol* 390, 330-337 (2009).
81. Kotenko, S.V., Sacconi, S., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V. & Pestka, S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci* 97, 1695-1700 (2000).
82. Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C. & Cloud, G. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *NE J Medicine* 360, 1191-1199 (2009).
83. McGeoch, D.J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F.E. & Telford, E.A. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Molec. Biol.* 247, 443-458 (1995).
84. Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stole, V., Zhu, H. & Liu, F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14223-14228 (2003).
85. Yu, D., Silva, M.C. & Shenk, T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12396-12401 (2003).
86. Barry, P.A. & Chang, W.-L.W. Primate Betaherpesviruses, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. (eds. A. Arvin, G. Campadielli, P. Moore, E. Mocarski, B. Roizman, R. Whitley & K. Yamanishi) 1051-1075 (Cambridge University Press, Cambridge; 2007).
87. Cunningham, C., Gatherer, D., Hilfrich, B., Baluchova, K., Dargan, D.J., Thomson, M., Griffiths, P.D., Wilkinson, G.W., Schulz, T.F. & Davison, A.J. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J Gen Virol* 91, 605-615 (2010).
88. Alford, C.A., Stagno, S. & Pass, R.F. Natural history of perinatal cytomegaloviral infection. *Ciba Found Symp*, 125-147 (1979).
89. Barry, P., Marthas, M., Lerche, N., McChesney, M. & Miller, C. Virology Research, in *The Laboratory Primate: Handbook of Experimental Animals*. (ed. S. Wolfe-Coote) 561-578 (Elsevier Academic Press, Burlington; 2005).
90. Barry, P.A. & Strelow, L. Development of Breeding Populations of Rhesus Macaques That Are Specific Pathogen Free for Rhesus Cytomegalovirus. *Comparative Medicine* 58, 43-46 (2008).

91. Vogel, P., Weigler, B.J., Kerr, H., Hendrickx, A. & Barry, P.A. Seroepidemiologic studies of cytomegalovirus infection in a breeding population of rhesus macaques. *Lab Anim Sci* 44, 25-30 (1994).
92. Adler, S.P. The molecular epidemiology of cytomegalovirus transmission among children attending a day care center. *J. Infect. Dis.* 152, 760-768 (1985).
- 5 93. Adler, S.P. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: evidence for viral transmission to parents from children infected at a day care center. *Pediatr Infect Dis* 5, 315-318 (1986).
94. Adler, S.P. Cytomegalovirus infection in parents of children at day-care centers. *The New England journal of medicine* 315, 1164-1165 (1986).
95. Adler, S.P. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: viral transmission among children attending a day care center, their parents, and caretakers. *J Pediatr* 112, 366-372 (1988).
- 10 96. Adler, S.P. Cytomegalovirus and child day care: risk factors for maternal infection. *Pediatr Infect Dis J* 10, 590-594 (1991).
97. Marshall, B.C. & Adler, S.P. The frequency of pregnancy and exposure to cytomegalovirus infections among women with a young child in day care. *Am J Obstet Gynecol* 200, 163e161-165 (2009).
- 15 98. Revello, M.G., Campanini, G., Piralla, A., Furione, M., Percivalle, E., Zavattoni, M. & Gerna, G. Molecular epidemiology of primary human cytomegalovirus infection in pregnant women and their families. *J. Med. Virol.* 80, 1415-1425 (2008).
99. Butler, L.M., Neilands, T.B., Mosam, A., Mzolo, S. & Martin, J.N. A population-based study of how children are exposed to saliva in KwaZulu-Natal Province, South Africa: implications for the spread of saliva-borne pathogens to children. *Trop Med Int Health* 15, 442-453 (2010).
- 20 100. Hendrie, C.A. & Brewer, G. Kissing as an evolutionary adaptation to protect against Human Cytomegalovirus-like teratogenesis. *Med Hypotheses* 74, 222-224 (2010).
101. Grosjean, J., Hantz, S., Cotin, S., Baclet, M.C., Mengelle, C., Trape, L., Virey, B., Undreiner, F., Brosset, P., Pasquier, C., Denis, F. & Alain, S. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *J Clin Virol* 46 Suppl 4, S43-48 (2009).
- 25 102. Rosenthal, L.S., Fowler, K.B., Boppana, S.B., Britt, W.J., Pass, R.F., Schmid, S.D., Stagno, S. & Cannon, M.J. Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss: results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 28, 515-520 (2009).
103. Abel, K., Martinez, J., Yue, Y., Lacey, S.F., Wang, Z., Strelow, L., Dasgupta, A., Li, Z., Schmidt, K.A., Oxford, K.L., Assaf, B., Longmate, J.A., Diamond, D.J. & Barry, P.A. Vaccine-induced Control of Viral Shedding Following Rhesus Cytomegalovirus Challenge in Rhesus Macaques. *J. Virol.* in press (2011).
- 30 104. Donnelly, R.P., Sheikh, F., Dickensheets, H., Savan, R., Young, H.A. & Walter, M.R. Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 393-401 (2010).
105. Josephson, K., Jones, B.C., Walter, L.J., DiGiacomo, R., Indelicato, S.R. & Walter, M.R. Noncompetitive antibody neutralization of IL-10 revealed by protein engineering and x-ray crystallography. *Structure (Camb)* 10, 981-987 (2002).
- 35 106. Josephson, K., Logsdon, N.J. & Walter, M.R. Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity* 15, 35-46 (2001).
107. Schreiber, G. & Walter, M.R. Cytokine-receptor interactions as drug targets. *Curr Opin Chem Biol* 14, 511-519 (2010).
108. Yoon, S.I., Jones, B.C., Logsdon, N.J., Harris, B.D., Deshpande, A., Radaeva, S., Halloran, B.A., Gao, B. & Walter, M.R. Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure* 18, 638-648 (2010).
- 40 109. Yoon, S.I., Jones, B.C., Logsdon, N.J. & Walter, M.R. Same structure, different function crystal structure of the Epstein-Barr virus IL-10 bound to the soluble IL-10R1 chain. *Structure* 13, 551-564 (2005).
110. Yoon, S.I., Logsdon, N.J., Sheikh, F., Donnelly, R.P. & Walter, M.R. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J. Biol. Chem.* 281, 35088-35096 (2006).
- 45 111. Liu, Y., Malefyt, R.d.W., Briere, F., Parhan, C., Bridon, J.-M., Banchereau, J., Moore, K.W. & Xu, J. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* 158, 604-613 (1997).
112. Wang, J.B., Adler, S.P., Hempfling, S., Burke, R.L., Duliege, A.M., Starr, S.E. & Plotkin, S.A. Mucosal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B occur following both natural infection and immunization with human cytomegalovirus vaccines. *J. Infect. Dis.* 174, 387-392. (1996).
113. Oxford, K.L., Strelow, L., Yue, Y., Chang, W.-L.W., Schmidt, K.A., Diamond, D.J. & Barry, P.A. UL/b'-Encoded Open Reading Frames Are Essential for Shedding and Horizontal Transmission of Rhesus Cytomegalovirus in Rhesus Monkeys. submitted (2011).
- 50 114. Chang, W. & Barry, P. Attenuation of innate immunity by cytomegalovirus IL-10 establishes a long-term deficit of adaptive antiviral immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 107, 22647-22652 (2010).
115. Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R.D. & Nelson, J.A. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* 78, 10960-10966 (2004).
- 55 116. Abel, K., Strelow, L., Yue, Y., Eberhardt, M.K., Schmidt, K.A. & Barry, P.A. A heterologous DNA prime/protein boost immunization strategy for rhesus cytomegalovirus. *Vaccine* 26, 6013-6025 (2008).
117. Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S. & Ganne, V. Montanide ISA 720 y 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert review of vaccines* 1, 111-118 (2002).
- 60 118. Aucouturier, J., Ganne, V. & Laval, A. Efficacy and safety of new adjuvants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 600-604 (2000).
119. Lockridge, K.M., Sequar, G., Zhou, S.S., Yue, Y., Mandell, C.M. & Barry, P.A. Pathogenesis of experimental rhesus cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 73, 9576-9583 (1999).

120. Sequer, G., Britt, W.J., Lakeman, F.D., Lockridge, K.M., Tarara, R.P., Canfield, D.R., Zhou, S.S., Gardner, M.B. & Barry, P.A. Experimental coinfection of rhesus macaques with rhesus cytomegalovirus and simian immunodeficiency virus: pathogenesis. *J. Virol.* 76, 7661-7671. (2002).
121. Yue, Y., Kaur, A., Eberhardt, M.K., Kassiss, N., Zhou, S.S., Tarantal, A.F. & Barry, P.A. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing rhesus cytomegalovirus glycoprotein B, phosphoprotein 65-2, and viral interleukin-10 in rhesus macaques. *J. Virol.* 81, 1095-1109 (2007).
122. Yue, Y., Wang, Z., Abel, K., Li, J., Strelow, L., Mandarino, A., Eberhardt, M.K., Schmidt, K.A., Diamond, D.J. & Barry, P.A. Evaluation of Recombinant Modified Vaccinia Ankara Virus-Based Rhesus Cytomegalovirus Vaccines in Rhesus Macaques. *Med Microbiol Immunol* 197, 117-123 (2008).
123. Chang, W.L., Tarantal, A.F., Zhou, S.S., Borowsky, A.D. & Barry, P.A. A recombinant rhesus cytomegalovirus expressing enhanced green fluorescent protein retains the wild-type phenotype and pathogenicity in fetal macaques. *J. Virol.* 76, 9493-9504 (2002).
124. Read, J.S., Cannon, M.J., Stanberry, L.R. & Schuval, S. Prevention of mother-to-child transmission of viral infections. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 38, 274-297 (2008).
125. Kenneson, A. & Cannon, M.J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 17, 253-276 (2007).
126. Cheung, A.K., Gottlieb, D.J., Plachter, B., Pepperl-Klindworth, S., Avdic, S., Cunningham, A.L., Abendroth, A. & Slobedman, B. The role of the human cytomegalovirus UL111A gene in down-regulating CD4+ T-cell recognition of latently infected cells: implications for virus elimination during latency. *Blood* 114, 4128-4137 (2009).
127. Hansen, S.G., Powers, C.J., Richards, R., Ventura, A.B., Ford, J.C., Siess, D., Axthelm, M.K., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., Picker, L.J. & Fruh, K. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science (New York, N.Y)* 328, 102-106 (2010).
128. Oxford, K.L., Eberhardt, M.K., Yang, K.W., Strelow, L., Kelly, S., Zhou, S.S. & Barry, P.A. Protein coding content of the U(L)b' region of wild-type rhesus cytomegalovirus. *Virol* 373, 181-188 (2008).
129. Joosten, S.A. & Ottenhoff, T.H. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Human Immunol.* 69, 760-770 (2008).
130. Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., Gonzalez-Perez, G., Munguia, R., Bajana, S., Meraz-Rios, M.A. & Sanchez-Torres, C. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 184, 1765-1775.
131. Shimamura, M., Murphy-Ullrich, J.E. & Britt, W.J. Human Cytomegalovirus Induces TGF-beta1 Activation in Renal Tubular Epithelial Cells after Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS pathogens* 6, e1001170 (2010).
132. Boppana, S.B., Smith, R.J., Stagno, S. & Britt, W.J. Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 30, 721-723 (1992).
133. Wu, X. & Jackson, S. Plasma and salivary IgG subclasses in HIV type 1 infection: evidence of both transudation and local synthesis of IgG in parotid saliva. *AIDS research and human retroviruses* 16, 1423-1431 (2000).
134. Robbins, J.B., Schneerson, R. & Szu, S.C. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J. Infect. Dis.* 171, 1387-1398 (1995).
135. Wrammert, J., Koutsonanos, D., Li, G.M., Edupuganti, S., Sui, J., Morrissey, M., McCausland, M., Skountzou, I., Hornig, M., Lipkin, W.I., Mehta, A., Razavi, B., Del Rio, C., Zheng, N.Y., Lee, J.H., Huang, M., Ali, Z., Kaur, K., Andrews, S., Amara, R.R., Wang, Y., Das, S.R., O'Donnell, C.D., Yewdell, J.W., Subbarao, K., Marasco, W.A., Mulligan, M.J., Compans, R., Ahmed, R. & Wilson, P.C. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine* 208, 181-193 (2011).
136. Britt, W.J. & Harrison, C. Identification of an abundant disulfide-linked complex of glycoproteins in the envelope of guinea pig cytomegalovirus. *Virol* 201, 294-302 (1994).
137. Britt, W.J. & Vugler, L.G. Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *J. Virol.* 66, 6747-6754 (1992).
138. Li, L., Coelingh, K.L. & Britt, W.J. Human cytomegalovirus neutralizing antibody-resistant phenotype is associated with reduced expression of glycoprotein H. *J. Virol.* 69, 6047-6053 (1995).
139. Shimamura, M., Mach, M. & Britt, W.J. Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M (gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *J. Virol.* 80, 4591-4600 (2006).
140. Urban, M., Klein, M., Britt, W.J., Hassfurth, E. & Mach, M. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Genl Virol* 77, 1537-1547 (1996).
141. Li, L., Nelson, J.A. & Britt, W.J. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J. Virol.* 71, 3090-3097 (1997).
142. Kropff, B., Koedel, Y., Britt, W. & Mach, M. Optimal replication of human cytomegalovirus correlates with endocytosis of glycoprotein gpUL132. *J. Virol.* 84, 7039-7052 (2010).
143. Loh, L.C., Balachandran, N. & Britt, W.J. Characterization of a membrane-associated phosphoprotein of murine cytomegalovirus (pp50) and its immunological cross-reactivity with a human cytomegalovirus protein. *Virol* 183, 181-194 (1991).
144. Rapp, M., Messerle, M., Bühler, B., Tannheimer, M., Keil, G.M. & Koszinowski, U.H. Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* 66, 4399-4406 (1992).
145. Britt, W.J., Vugler, L., Butflowski, E.J. & Stephens, E.B. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-vaccinia recombinant virus-infected cells in analysis of the human neutralizing response. *J. Virol.* 64, 1079-1085 (1990).
146. Boppana, S.B. & Britt, W.J. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* 171, 1115-1121 (1995).

147. Yue, Y., Kaur, A., Zhou, S.S. & Barry, P.A. Characterization and immunological analysis of the rhesus cytomegalovirus homologue (Rh112) of the human cytomegalovirus UL83 lower matrix phosphoprotein (pp65). *J Genl Virol* 87, 777-787 (2006).
148. Funaro, A., Gribaudo, G., Luganini, A., Ortolan, E., Lo Buono, N., Vicenzi, E., Cassetta, L., Landolfo, S., Buick, R., Falciola, L., Murphy, M., Garotta, G. & Malavasi, F. Generation of potent neutralizing human monoclonal antibodies against cytomegalovirus infection from immune B cells. *BMC Biotechnol* 8, 85 (2008).
149. Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T. & Igarashi, T. Isolation of Potent Neutralizing Monoclonal Antibodies from an SIV-Infected Rhesus Macaque by Phage Display. *AIDS research and human retroviruses* (2010).
150. Smith, K., Garman, L., Wrammert, J., Zheng, N.Y., Capra, J.D., Ahmed, R. & Wilson, P.C. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat. Protoc.* 4, 372-384 (2009).
151. Tiller, T., Busse, C.E. & Wardemann, H. Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. *Journal of immunological methods* 350, 183-193 (2009).
152. Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C. & Wardemann, H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *Journal of immunological methods* 329, 112-124 (2008).
153. Lanzavecchia, A., Corti, D. & Sallusto, F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol* 18, 523-528 (2007).

Ejemplo 6. Inmunización con ADN/proteína y desafío con RhCMV de macacos rhesus

Los constructos de ADN de expresión recombinante, pND/rhcmvIL-10M1 y pND/rhcmvIL-10M2 (1), se purificaron mediante el uso de un kit de purificación de plásmidos libres de endotoxinas (Qiagen) y la concentración se determinó espectrofotométricamente. El ADN se diluyó luego en tampón PBS a 1 mg/ml y se almacenó a -80 ° C. Las proteínas rhcmvIL-10M1 y rhcmvIL-10M2 se transfectaron mediante el uso de un sistema de vector de expresión pMT en células S2 de *Drosophila* y se purificaron mediante un protocolo de purificación por afinidad de níquel como se describió anteriormente (1).

Cuatro macacos rhesus RhCMV negativos se inmunizaron con una combinación de rhcmvIL-10M1 y rhcmvIL-10M2 mediante el uso de una estrategia dual de ADN/proteína. Los animales se inmunizaron primero con el plásmido rhcmvIL-10M1/M2 (150 µg intramuscular (IM); 50 µg inyección intradérmica (ID)) en la semana 0 y posteriormente se administraron tres dosis de proteína rhcmvIL-10M1/M2 (50 µg cada una de M1 y M2 IM) a las semanas 6, 12 y 26. Las proteínas se adyuvan en Montanide ISA 720, como se describe (1). Los cuatro macacos inmunizados y 4 controles adicionales de macacos rhesus seronegativos a RhCMV se desafiaron después subcutáneamente con una UCD59 variante de RhCMV de UC Davis CNPRC (RhCMV_{UCD59}) a 1000 pfu en cuatro lugares separados en la parte posterior del animal.

Extracción del ADN

El ADN viral se extrajo del plasma, el hisopo oral y orina mediante el uso del kit QiaSymphony (Qiagen). Las muestras se extrajeron siguiendo los protocolos del fabricante y se almacenaron para su uso a -80 ° C.

PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real que cuantifica el ADN de RhCMV en plasma, hisopos orales y orina se realizó de acuerdo con los protocolos publicados previamente (2). Los cebadores y las sondas se diseñaron para el gen gB de RhCMV con TET colocado en el extremo 5' de la sonda como colorante reportero y el colorante desactivador, 6-carboximetilrodamina (TAMRA) colocado en el extremo 3' (Applied Biosystems, Foster City, Ca). El volumen total de cada PCR fue de 12,5 µl mediante el uso de la mezcla maestra de PCR universal Taqman IX (Applied Biosystems) con 17,5 pmol de cebadores directos e inversos, sonda de 2,5 pmol y muestra de ADN de 5 µl. qPCR se realizó utilizando el sistema de detección de secuencias ABI prism 7900. Todas las muestras se corrieron por triplicado y se cuantificaron utilizando una curva estándar de dilución en serie de 10 veces del plásmido gB de RhCMV que contiene 10⁶ a 10⁰ copias por 5 µl.

ELISA para detectar anticuerpos rhcmvIL-10

Los anticuerpos de unión contra rhcmvIL-10 se caracterizaron por ELISA (1). En resumen, las microplacas de 96 pocillos (Immulon 4 HBX, Dynex Technologies Inc.) se cubrieron toda la noche a 4 ° C con rhcmvIL-10 purificado por afinidad de níquel (12,5 ng/pocillo) en tampón de recubrimiento (solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma)/0,375 % de bicarbonato de sodio (GIBCO)). Cada placa se lavó subsecuentemente 6 veces con PBS/0,05 % Tween 20 (Sigma) (PBS-T) y se bloqueó con 300 µl/pocillo de PBS/1% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) durante 2 horas a 25 ° C en una incubadora con temperatura controlada. Después de lavar las placas 6 veces con PBS-T, se añadieron 100 µl de una dilución 1:100 de plasma de monos rhesus (en PBS-T/1% de BSA), o 100 µl de hisopo oral en PBS (1:10 concentración final) a cada pozo y se incubó a 25 ° C durante 2 horas. Cada muestra se evaluó por triplicado. Las placas se lavaron subsecuentemente 6 veces con tampón de lavado PBS-T y se cargaron con 100 µl/pocillo de una dilución 1:120 000 de IgG de cabra-anti-mono conjugada a peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc - KPL) y se incubaron a 25 ° C durante 1 hora. Las placas se lavaron después 6 veces con tampón de lavado PBS-T y se añadió 100 µl/pocillo de sustrato de tetrametilbenzidina líquido (TMB) (Sigma) y se incubaron durante 30 min a 25 ° C. El desarrollo del color de TMB se detuvo por la adición de 50 µl/pocillo de 0,5 M de ácido sulfúrico. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura

ambiente, el desarrollo del color se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas Modelo 680 (BioRad). El umbral para que una muestra se considere positiva para una respuesta específica del anticuerpo rhcmvIL-10 se estableció en 3 desviaciones estándar por encima de la densidad óptica media seronegativa de control derivada de 30 muestras seronegativas.

5 ELISA de RhCMV

El ELISA de RhCMV se realizó similar al ELISA de rhcmvIL-10 con ligeras variaciones. Las microplacas de 96 pocillos se recubrieron con 0,25 µg/pocillo de viriones inactivados por calor de RhCMV en un tampón de recubrimiento y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Luego, las placas se lavaron con PBS/T y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente (RT) con plasma o hisopo oral (diluciones 1:100 o 1:10 en PBS/T, respectivamente). Las placas se lavaron con PBS/T y luego se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti-mono de cabra conjugada con peroxidasa diluida en PBS/T a 1:190 000. Las placas se desarrollaron y cuantificaron de manera idéntica al ELISA de rhcmvIL-10.

15 Ensayo de avidez de los anticuerpos contra rhcmvIL-10

La unión por avidez de anticuerpos contra rhcmvIL-10 se evaluó de manera similar al protocolo de ELISA, excepto que después de la incubación primaria de 2 horas con el plasma diluido, los pocillos se incubaron en 6M de urea recién preparada durante cinco minutos a temperatura ambiente, y se lavaron después extensamente con PBS-T. El anticuerpo secundario de cabra anti-mono se añadió después durante 1 hora, y las placas se lavaron y procesaron para el desarrollo colorimétrico de acuerdo con el protocolo de ELISA. El Índice de Avidez (AI) se calculó al dividir la densidad óptica media de una muestra tratada con 6M de urea por la densidad óptica media de la muestra no tratada con 6M de urea.

25 Neutralización de la función rhcmvIL-10 *in vitro*

Los anticuerpos en plasma de animal dirigidos contra rhcmvIL-10 se caracterizaron por un ensayo de neutralización de proteínas basado en células (1) con modificaciones menores. En resumen, las muestras de plasma se diluyeron (1:1000) en RPMI/10 % de suero fetal bovino/penicilina-estreptomicina/L-glutamina (1 mL volumen final) en presencia o ausencia de rhcmvIL-10 recombinante (1,0 ng/mL) durante 3 horas a 37 °C. 200 µL de mezclas de plasma +/-rhcmvIL-10 se incubaron después (cada uno por triplicado) con 4 x 10⁵ PBMC purificados por Ficoll/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Falcon) durante 30 minutos en una incubadora con humedad a 37 °C (5 % de CO₂). Lipopolisacárido (LPS) (de *E. coli* O127:B8; Sigma) se añadió después a las células (5 µg/mL concentración final) y las células se incubaron 24 horas a 37 °C (5 % de CO₂). El sobrenadante se colectó el día siguiente y se almacenó a -80 °C hasta ensayarse para la producción de IL-12. La secreción de IL-12 por los PBMC activados con LPS se midió por ELISA (U-Cytech, Holanda), de acuerdo con el protocolo del fabricante con ligeras variaciones. En resumen, las microplacas de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) se recubrieron con el par de anticuerpos IL-12 suministrado (p40 + p70) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 6 veces con PBS-T y se incubaron con PBS/1% de tampón de bloqueo BSA durante 60 minutos a 37 °C. El tampón se eliminó, se agregaron 100 µL/pocillo de sobrenadante de PBMC y la mezcla de células se incubó a 4 °C durante toda la noche. Las placas se lavaron después 6 veces con tampón de lavado PBS-T, se añadió 100 µL/pocillo de anticuerpo anti-mono detector de ELISA, y las células se incubaron 1 hr a 37 °C. Después del lavado, se añadió 100 µL/pocillo de polímero de estreptavidina-HR (SPP) conjugado (U-Cytech) y se incubaron a 37 °C durante 1 hr. Después del lavado, se añadió el sustrato TMB (100 µL/pocillo), y las placas se incubaron a 25 °C durante 11 min. El desarrollo del color se detuvo por la adición de 0,5 M de ácido sulfúrico (50 µL/pocillo). Luego de una incubación de 5 minutos (25 °C), las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas Modelo 680 (BioRad). Las concentraciones de IL-12 se cuantificaron mediante el uso de un estándar de IL-12 recombinante diluido en serie 2 veces (U-Cytech) que se incluyó en cada placa. La neutralización se calculó como el inverso de la relación de (concentración de IL-12 + rhcmvIL-10 + plasma)/(concentración de IL-12 + plasma solo) y se expresó como el "por ciento (%) de IL-10 neutralizada."

50 Tinción de citocinas intracelulares (ICS)

Para evaluar las respuestas de las células T a rhcmvIL-10, las PBMC purificadas con gradiente de Ficoll criogénicamente conservadas se descongelaron y descansaron durante la noche a 37 °C en medio RPMI completo que contenía FCS libre de endotoxinas al 10 %. L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, estreptomicina 100 µg/ml, 2-mercaptoetanol 50 µM y Hepes 10 mM y se tiñeron (3) con leves modificaciones. Brevemente, las PBMC (2,5x10⁶ células/mL en placas de 48 pocillos) se trataron con viriones de RhCMV inactivados por calor (10,0 µg/mL), proteínas rhcmvIL-10 no funcionales rhcmvIL-10M1 y rhcmvIL-10M (5,0 µg/mL), o medios solos en presencia de anticuerpos monoclonales coestimuladores para CD28 (clon 28.2) y CD49d (clon 9F10) (5 µg/mL cada uno; ebiosciences) durante 6,5 horas con la adición de Golgistop y Golgiplug después de primeras 1,5 horas. La tinción de la superficie se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales directamente conjugados contra CD3 humano (con reactividad cruzada con macacos rhesus) (clon SP34-2), CD4 (clon L200) y CD8 (SKI del clon) (BD Biosciences). Las células se fijaron y se permeabilizaron luego mediante el uso del kit de Fijación/Permeabilización (BD Biosciences) y las células se tiñeron internamente para IFN-γ (clon 4S.B3; BD Biosciences). Se estableció un valor basal de fondo para cada animal mediante la corrida de una muestra paralela sin estimulación con antígeno. Este valor se restó de la muestra correspondiente estimulada con antígeno.

65 Citometría de flujo

Se realizó citometría de flujo de cuatro colores mediante el uso del software FACSCalibur con CellQuest (BD Biosciences). Los resultados se analizaron y se mostraron mediante el uso del software FlowJo (Tree Star).

5 Microscopía

Las biopsias de piel se fijaron en paraformaldehído, se embebieron en parafina, se seccionaron en serie y se procesaron para la tinción H&E y el marcado de inmunofluorescencia. Todas las secciones se desparafinizaron con xileno al 100% (3 lavados, 5 minutos cada uno) y se lavaron 3 veces en etanol al 100% (EtOH). La actividad de peroxidasa endógena se inactivó sumergiendo las secciones en 3 % de H₂O₂ en metanol (MeOH) durante 20 minutos seguidos por 2 lavados adicionales de EtOH al 100% y un lavado en 95 % y 70 % de EtOH cada uno. Las secciones se lavaron luego durante 10 minutos en H₂O desionizada y se trataron con una solución de antígeno DECLOAKER (Biocare Medical) durante 4 horas a 97 °C y se llevaron gradualmente a temperatura ambiente (RT). Después de lavar las muestras en PBS (2 veces, 5 minutos cada una), las muestras se bloquearon en Dako Universal Blocker (Invitrogen) durante 30 minutos. Las secciones se tiñeron luego con anticuerpos monoclonales que reaccionan de forma cruzada con CD68 de mono (KP1) (Thermo Scientific) y anticuerpos policlonales de conejo anti-RhCMV IE-1. Las secciones se lavaron y luego se tiñeron de manera fluorescente con DyLight 488 y DyLight 595 (Vector Labs) y subsecuentemente se montaron con reactivo antidesvanecimiento Prolong Gold con Dapi (Invitrogen). Las imágenes se tomaron mediante el uso de luz fluorescente y un filtro de un solo paso (Óptica Omega) con una cámara digital (Axiscam, Carl Zeiss, Alemania) operada por el software AxioVision. Las imágenes se procesaron con Adobe Photoshop (sistemas Adobe).

Análisis Estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó mediante el uso de Prism 4 (GraphPad Software Inc.).

25

Respuestas de anticuerpos en macacos rhesus inmunizados

Se inmunizaron cuatro macacos rhesus seronegativos a RhCMV con una combinación de plásmidos de expresión de rhcmvIL-10M1 y rhcmvIL-10M2 (rhcmvIL-10M1/M2) seguido de 3 refuerzos de proteína rhcmvIL-10M1/M2 purificada de acuerdo con la Figura 21. Como se describió anteriormente (1), rhcmvIL-10M1 y rhcmvIL-10M2 tienen dos mutaciones puntuales que los hacen biológicamente no funcionales. Esto permite la producción de anticuerpos anti-rhcmvIL-10 desarrollados tras la inmunización, en ausencia de la actividad inmunosupresora de la citocina rhcmvIL-10 de silvestre. La vacuna rhcmvIL-10M1/M2 estimuló altos títulos de anticuerpos de unión con una cinética comparable entre los cuatro animales (Figura 22A). Mientras que la inmunización inicial con el plásmido de ADN provocó niveles mínimos de anticuerpos con solo un animal midiendo los niveles detectables, todos los animales fueron positivos para Ab específicos para rhcmvIL-10 en la semana 8 después de la inmunización (p.i.), dos semanas después del primer refuerzo de proteínas (administrado en la semana 6 p.i.). Los subsecuentes refuerzos de proteína (a las semanas 12 p.i. y 26 p.i.) generaron rápidos aumentos de anticuerpos de unión con un promedio de absorbancia (A₄₅₀) de 1,5 en el momento del desafío (semana 34 p.i.). No se presentaron anticuerpos específicos contra rhcmvIL-10 antes de la inmunización.

40

Para determinar la eficacia de los anticuerpos de unión en el bloqueo de la actividad de rhcmvIL-10, se realizó un ensayo de neutralización de rhcmvIL-10. Este ensayo mide la producción de IL-12 en PBMC aislados estimulados con LPS. La producción de IL-12 se bloquea completamente mediante la adición de rhcmvIL-10 recombinante al ensayo. Por lo tanto, los anticuerpos neutralizantes (NAb) presentes en el plasma animal neutralizan la actividad biológica de rhcmvIL-10 recombinante, lo que resulta en un aumento en la producción de IL-12, que se monitorea mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 22B, 1 de los 4 animales vacunados desarrolló títulos de NAb 4 semanas después del refuerzo de proteína inicial (33 % de neutralización de rhcmvIL-10), mientras que todos los animales exhibieron NAb contra rhcmvIL-10 1 semana después del segundo refuerzo de proteína con un promedio de 46 % de actividad de rhcmvIL-10 neutralizada (Figura 22B). Tres animales demostraron un aumento en las NAb después del tercer refuerzo de proteína con niveles máximos (~ 100 % de neutralización de rhcmvIL-10) alcanzado en las semanas 27-30 p.i. (1-4 semanas después del tercer refuerzo con proteína). El tercer refuerzo proteico provocó solo un aumento moderado en los niveles de anticuerpos neutralizantes (~ 38 % de neutralización de rhcmvIL-10) en el animal restante. Estos hallazgos demuestran que los animales vacunados han desarrollado respuestas de anticuerpos eficaces para bloquear la función de rhcmvIL-10.

55 Respuestas inmunitarias después del desafío: La vacuna rhcmvIL-10M1/M2 altera el entorno de las células reclutadas en el lugar de la infección.

Seis semanas después del último refuerzo de proteínas, los cuatro macacos vacunados y un grupo control de cuatro macacos no vacunados se inocularon por vía subcutánea con 10³ p.f.u. de RhCMV_{UCD59} (Figura 21) Para observar la inducción de las respuestas inmunitarias locales al desafío viral, se tomaron biopsias de piel en el sitio de la inoculación una semana después del desafío (p.c.). Las tinciones de H&E revelaron que los animales inmunizados tuvieron disminuciones demostrables en el infiltrado global de células inflamatorias en el sitio de inoculación con una disminución específica en el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) (Figura 3). También hubo evidencia de un aumento de los restos celulares que indica la muerte de neutrófilos en los animales vacunados. Además, mientras que todavía muestra alguna diferencia, los vacunados que previamente tenían títulos bajos de NAb contra rhcmvIL-10 (37 % de neutralización de rhcmvIL-10 predesafío), tenían una respuesta inmunitaria más característica fenotípicamente de los

65

animales controles no vacunados con un aumento en el infiltrado de células inmunes y una mayor frecuencia de células PMN.

Las biopsias de piel también revelaron una disminución visible de las células infectadas en el sitio de la inoculación en el grupo de la vacuna en comparación con los controles. Específicamente, se observó una disminución en las células citomegálicas en la tinción de H&E, y cuando las secciones se tiñeron de manera inmunofluorescente para el antígeno RhCMV IE-1 (datos no mostrados). No hubo diferencias distinguibles en la frecuencia de macrófagos en el sitio de la infección como se visualiza mediante el uso de un anticuerpo monoclonal para CD68.

Respuestas inmunes contra RhCMV y rhcmvIL-10

Las respuestas de anticuerpos de unión a rhcmvIL-10 después del desafío se midieron en los grupos vacunados y de control (Figura 24A). Los animales vacunados mostraron títulos máximos de anticuerpos de unión en el momento del desafío. Por el contrario, los títulos de anticuerpos de unión a rhcmvIL-10 en animales controles no pudieron detectarse hasta ~ 3 semanas después del desafío. (Figura 24A) Tres animales vacunados exhibieron altos niveles de NAb contra RhcmvIL10 que persistieron durante 8 semanas p.c. (Figura 25). El vacunado restante mantuvo niveles bajos de NAb contra rhcmvIL-10 (~ 10 % de neutralización de rhcmvIL-10), disminuyendo subsecuentemente a niveles indetectables. A diferencia del grupo vacunado, los NAb contra rhcmvIL-10 no se detectaron en el grupo control hasta 7-10 semanas p.c. y alcanzó un nivel medio de 85 % de neutralización de rhcmvIL-10 en la semana 20 p.c. (Figura 25).

Los títulos totales de anticuerpos en plasma contra RhCMV aumentaron con una cinética esencialmente idéntica y alcanzaron niveles similares entre los grupos de vacuna y de control (Figura 24A). Se observaron cinéticas y títulos de anticuerpos similares en todos los animales con detección inicial de anticuerpos a partir de 2-4 semanas p.c., aumentando a niveles medianos de 1,3 A₄₅ en el grupo vacunado y 1,4 A₄₅₀ en los controles por semana 24 p.c. La aparente fuerza de unión de los Ab fue similar, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el ensayo de avidéz.

Dado que se observaron diferencias en la patología celular en el sitio de la infección después del desafío viral (Figura 23), los niveles de anticuerpos contra rhcmvIL-10 y RhCMV de unión a la mucosa se midieron mediante hisopos orales (Figura 24B). Estos estudios se realizaron para estimar los niveles de anticuerpos (Ab) presentes en la piel y otros tejidos en el momento del desafío y durante el curso de la infección. Los títulos de anticuerpos de unión detectados en la saliva fueron más bajos que en el plasma. Sin embargo, similar a lo que se observó en plasma, los anticuerpos de unión a RhCMV se desarrollaron con una cinética esencialmente idéntica y a niveles generales similares en los grupos de la vacuna y de control. (Figura 24B). El análisis de los anticuerpos de unión a rhcmvIL-10 reveló niveles bajos pero significativos de anticuerpos IgG específicos para rhcmvIL-10 presentes en la saliva del grupo de la vacuna (nivel mediano = 0,052 A₄₅₀), que persistió hasta 6 semanas p.c. (Figura 24B). Por el contrario, los animales controles nunca desarrollaron niveles positivos de anticuerpos específicos contra rhcmvIL-10 durante todo el curso del estudio.

Los estudios anteriores en macacos rhesus seropositivos a RhCMV han demostrado que las respuestas de anticuerpos inducidas, o reforzadas, por las inmunizaciones con rhcmvIL-10M1/M2 no reaccionan de manera cruzada con rhIL-10 celular. Para verificar que esto también es cierto después de la vacunación de animales seronegativos a RhCMV, se probaron anticuerpos séricos de todos los animales vacunados y se encontró que no tenían reactividad cruzada con rhIL-10 celular.

Vacuna de rhcmvIL-10 redujo la frecuencia y la magnitud de las cargas virales plasmáticas y la diseminación viral

Para evaluar si la vacuna de rhcmvIL-10M1/M2 confiere protección al RhCMV, también se evaluaron muestras de plasma, hisopo oral y orina para cargas de ADN viral mediante el uso de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para medir los niveles de gB de RhCMV. El grupo de la vacuna tuvo una frecuencia significativamente menor de muestras de plasma positivas al ADN del RhCMV (Figura 26A, p=0,0286). Para el grupo de los animales vacunados, nunca se detectó ADN viral, mientras que las tres vacunas restantes fueron positivas en un solo momento, 1 semana p.c. Las muestras de plasma de animal control fueron positivas para ADN viral, 1 semana p.c., y continuaron mostrando niveles bajos intermitentes de ADN viral en su plasma a lo largo del curso del estudio.

Los animales vacunados exhiben frecuencias significativamente más bajas, y magnitudes de eliminación de RhCMV, en fluidos corporales, según lo monitoreado por el ensayo qPCR para gB de RhCMV (Figuras 27 y 28, p=0,014). Dos animales vacunados evidenciaron una ausencia completa de eliminación viral en la saliva y los 2 vacunados restantes fueron positivos en 2 y 3 puntos de tiempo (semanas 7 y 16 p.c. y semanas 12, 14 y 16 p.c. respectivamente; Figura 27). Por el contrario, todos los animales controles comenzaron a eliminar 6-7 semanas p.c. y continuaron eliminando cargas de virus significativamente mayores durante la duración del estudio. Las muestras de orina del grupo de la vacuna mostraron una frecuencia extremadamente baja de eliminación y no se encontró ningún virus en ningún momento en 3 de los animales, mientras que el animal restante mostró niveles bajos de eliminación intermitente (Figura 28). Todos los animales controles mostraron eliminación intermitente en la orina durante el transcurso del estudio. Interesantemente, los tres animales vacunados que eliminaron el virus en la saliva no tenían virus presente en la orina, mientras que a la inversa, el animal que carecía de eliminación en la saliva era el único eliminador de virus en la orina en el grupo de la vacuna. Adicionalmente, hubo un sol vacunado que careció completamente de cualquier evidencia de ADN de gB viral en el plasma y no eliminó el virus ni en la saliva ni en la orina durante todo el curso del estudio.

En asociación con las disminuciones en la propagación viral, se encontró que los animales vacunados tenían respuestas de células T específicas para rhcmvIL-10 a 0 o 4 semanas p.c. (Figura 29A). Las respuestas se monitorearon mediante la expresión de IFN- γ , que osciló entre el 0,005 % y el 0,02% de las células CD3+/CD4+ después de la estimulación con rhcmIL-10 M1/M2 (Figura 29A). Los animales controles nunca desarrollaron respuestas específicas a rhcmvIL-10. Adicionalmente, en la semana 4, se encontró que el 50 % de los animales vacunados tenían ~ 4 veces la frecuencia de activación de células T CD4+ específicas de RhCMV por la expresión de IFN- γ +, en comparación con la frecuencia media de los controles (0,12 % frente a 0,025 % de células T IFN- γ + CD4+ de células T CD4+ CD3+ activadas) (Figura 29B). Mientras que no alcanza importancia debido al pequeño tamaño de la muestra, los resultados siguen la tendencia de aumento de la defensa inmunitaria que presenta la disminución del ADN viral y la frecuencia de eliminación en el grupo de la vacuna.

Referencias para el Ejemplo 6

1. Logsdon y otros. Design and Analysis of Rhesus Cytomegalovirus IL-10 Mutants as a Model for Novel Vaccines against Human Cytomegalovirus PloS one, 2011. 6(11)
2. Sequer y otros. Experimental coinfection of rhesus macaques with rhesus cytomegalovirus and simian immunodeficiency virus: pathogenesis. J Virol 2002. 76(15):7661-71.
3. Oxford y otros. Open reading frames carried on UL/b' are implicated in shedding and horizontal transmission of rhesus cytomegalovirus in rhesus monkeys. J Virol 2011. 85(10):5105-14.

Aunque el presente proceso ha sido descrito con referencia a detalles específicos de ciertas modalidades de la misma, no se pretende que tales detalles se consideren como limitaciones del alcance de la invención excepto como y en la medida en que estén incluidos en las reivindicaciones adjuntas.

A lo largo de esta solicitud, varias patentes, publicaciones de patente, publicaciones no de patentes se referencian Las descripciones de estas patentes y publicaciones en su totalidad se incorporan como referencia en esta solicitud, con el fin de describir con más detalle el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Secuencias

RhCMV Cepa 68-1

ADN: Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AF200417

1 gcttattagataaccgtgtgttaagggaagggtgcagggctnagtttttgcgaaggtaagcctt
61 ctctacccccctacacatgcggactgtgtcttgagttaagtgtttgtnttttttctta
121 atagtattatcgtttincaagctggtgtgattgttcaggggggggtgcacatcttttagtgag
181 tgtgataccacgacgtagggtgtggtaacctgacaataatatctgttggttaggagaact
241 taaatgtgtattaggtattattctcttatgctgctaacagaattgcttctccgtaactat
301 tatcgtcttacagatagattgcgtttgttttttttcaagttcccagcaaaaacagg
361 gagtctgtggccttttggttcgtgtacatccgtgttcgcgtatcgaaattgatcttctgt
421 cgatgatgtagggtccttgatgtaggatttcgaatatcggtatttttcttttagcaaaag
481 tgagggttcgtgtaagtttctatacaaaacttatgtgaagtttatgacgttcgtttgttat
541 ctcgagagcggctcgaaccttcttctgtagagctttatttagtgcaactttacggggtgt
601 agaagctaaatgaatctctgaaggtgctactcatttacacttcgaagaacatccagttc
661 gtgaaaaaaacaagtgtcttcgaaatcatgtttccactattttgcaattacatctgtga
721 aagtaggcagtagataccagattctnttttannnttgtntgtctcttatacaatggacta
781 cgatgtttctcgagagtatgtcgtgaagctgtcngtgggtgtanatnagttgctattgtt
841 atttccctttgcacacacagttgtttcaattagatgtttgaccgtgatttgcaccaccg
901 gcccgggagacaaggcaaggagatntgtttntgcgtttgccatttatcatcgttattta
961 ctattagtgtgacaatgacctgtcagattgttgattactttttgggctacagactataa
1021 atcttcaaggatcgaggaaaagcaaaacaataggaaaaggggggggaccaccttacct
1081 gtggcgctctatctctgtttgcagcggcggtcggtgctgtgttttagcctggagaaggag
1141 acgagaacgacgaatcgccggttacaatgcggaggaggaggaggtccttgcgcacatcatcg
1201 tcgccggcgctatcggaacactactcatgatggcggtggtcgtgtttcagcccatgacc
1261 atgaacacaaaagaagtaccaccggcctgtgaccccggtcacggtaacttggcaggcatct
1321 tcaaggagttgcggggcgacctacgcttccattagagaagggttggtagttaggcaacgc
1381 agttctcggatgtcagtcggaatcgaggagtcacagctgtcgtatgtgatataattgc
1441 ttaatttttgtttgcagcaaaagaaggacacgggtgtactacacatcgctgttcaatgac
1501 cgcgtgtcctatgaaatgctgagtcctatgggctgtcgcgtgaccaatgaactcatggaa
1561 cattatttagatgggtgtttcgcctcgagcaagtcatttagactacgataatgacactctg
1621 aatggcttacatgtgtttgcttcatccatgcaggcgctgtatcagcacatgttaaaagtgt
1681 gtaagtgtttcaggttcgataaccccgcatatgacacgtaaatagcgatatcgtggcac
1741 cagacgtcagtcacagtcttccccggctgagacgcactcttatatcgcgatatatcgcgga
1801 ttatcgcagtatgtagccgatatatcgtgtcaaaagcactccgaacgacattctgatgacg

1861 gctatcgcttatgtcgcggtatatcgcggaatatcgagtatatcgcggttatgtcgcg
 1921 acataaccgtcatgtcgcgactatgccgcatatgccactatcgcgacttggcaccgtg
 5 1981 ccaacgatagtcgaccttaggggtggtcgtgtggtggggggctgcttgcggtttgcaa
 2041 accggagaggtagcacacgctgattgtcggttgaagcgttgtttacacatgtctttgtc
 2101 ttggcagcccgcgttggcatgtactggcaaacgccagcttgatgtacttcttggaggt
 10 2161 ggaacacaaggtcagttaaggttgcaggtaggttaaacgcagaaaccattgttctacc
 2221 ggtttctaaaaacgccgttcaacgtgtttgcagctcaaccctggaggggcacggcaaa
 2281 agccggcgccgaggtgaccttttctgaactacttgaaacgttctgctgcagttctg
 15 2341 agccagctgtcaatcaaggcagccaaaagcagcgttctcgggtttacaattctcgatcg
 2401 ttctgctagttaagctctaataaacgtactgtttaaccac c

Proteína: Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AAF59907 (SEQ ID NO:1)

MRRRRRSFGI IVAGAIGTLL MMAVVVLSAH DHEHKEVPPA CDPVHGNLAG
 IFKELRATYASIREGLQKKD TVYYTSLFND RVLHEMLSPM GCRVTNELME
 25 HYLDGVLPRASHLDDYDNSTLNLHVFASSM QALYQHMLKC PALACTGKTP
 AWMYFLEVEH KLNPPWRGTAK AAAEADLLLNYLETFLQF

RhCMV Cepa MMU28684

ADN: Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AF200740

1 gcagtagataccagattcttttagttgtctcttatacaatggactacgatgtttctc
 35 61 gagagtatgtcgaagcttgcctggtgtagatcaggtgctactgttatttcttttg
 121 cacacacagttgttcaattagatgttgaccgtgatttggccacccggccgggagac
 181 aaggcaaggagattgtttttgcgttgcatttatcatcgctatttactattagtgt
 40 241 gacaatgacctgtcagattgttattttttggctacagactataaatcttcaagga
 301 tcaaggaagaaagcaacaataggaaaggaagaaaggaccaccttacctgtggcgtctca
 361 ttctctgttcagcggcggtcgtgtgttttagcccgagagaaggagacgggaacgac
 45 421 gaatcggcggttacaatcggaggaggaggggttttcgacatcatcgtcggcgct
 481 atcggaaactactcatgatggcggtggtcgtgttccagccatgacctgaacacaaa
 541 gaagtaccaccggcctgtgaccccggtcacggaacttggcagggcatcttcaaggagttg
 50 601 cggcgacactacgttccattagagaaggtttggtatgttaggcaacgcagttctcgat
 661 gtcagtcggatcggaggagtcacagctgtcatgtgatgatattgttcattttgt
 721 ttgtagcaaaagaaggacgggtgtactacacatcgctgttcaatgagcgcgtgtcca
 55 781 tgaaatgctgagtcctatgggctgtcgcgtgaccaacgaactcatggaacattattaga
 841 tgggtgttcgctcagcaagtcatttagactacgataatgacctctgaatggcttaca
 901 tgtgtttgcttcatccatgcaggcgtgtatcagcacatgttaagtgtaagtgttc

961 aggttcgataaccccgcatatgacacgtaaatagcgatatcggtgaccagacgtcagt
 1021 cacagtcttccctgggtggagacgcatttatatcgcatatcgcggtatcgagta
 5 1081 tgttgcgatatatcggtcagaacactccgaacgacattctaagcagactatcgctta
 1141 tgcgcggtatatcgcggaatatcgagtatgtcgcggttatgtcgcgacataaccgtca
 1201 tgcgcgactatcgccgcatatgccactatcgcgacttggcacggtgccaacaatagtt
 10 1261 gcctctagggtggtcgtgtggtgtagggggtgcttgcggttgcacaaaccggagaggtta
 1321 gcacacgctgattgtcgggttggaaacgtgtttacgcatgtctttgttggcagccccg
 1381 cgttggcatgtactggcaaacgccagcttgatgtacttctggaggtggaacacaagg
 15 1441 tcagttaaggtgccaggtaggttaaacgcagaaaccattgttctaccggttctctaaa
 1501 acgccgttcaacgtgttttcgagctcaaccctggagggggcacggcaaaagccgcggccg
 1561 aggctgaccttttgcgaactacttgaaacgttctgctgcagttctgagccagctgtc
 20 1621 aatcaaggcagccaaaagcagcgttctcgggtttacaattctcgatcgttctgctagt
 1681 aagctctaataaacgtactgtttaaccac

Proteína: Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AAF61204 (SEQ ID NO:2)

25 MRRRRGSFDI IVAGAIGTLL MMAVVVLSAH DHEHKEVPPA CDPVHGNLAG
 IFKELRATYASIREGLQKKD TVYYTSLFNE RVLHEMLSPM GCRVTNELME
 30 HYLDGVLPRASHLDDYNSTLNLHVFASSM QALYQHMLKC PALACTGKTP
 AWMYFLEVEH KLNPRWGTA AAAEADLLLNYLETFLQF

HCMV Cepa Towne

35 ADN: Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AF202536

1 atgctgtcgggtgatggtctcttctctgtgctgatcgtctttttctaggcgcttcc
 61 gaggaggcgaagccggcgacgacgacgataaagaatacaagccgcagtgctgcca
 40 121 gaggattacgcgaccagattgcaagatctccgctcacctttcatcgagtaaacctacg
 181 ttgcaacgtgaggacgactactccgtgtggtcgcaggtacgggtggtcaaaggctgttgg
 241 ggatgcagcgtcatggactgggtgtgaggcggatctggagatcgtgtccccgcaggc
 45 301 gaccacgtctatcccgactcaagacggaattgcatagtagcgcctcgacgctagaatcc
 361 atctacaagacatgcggcaatgccctctgttaggttgcggagataagtcggtgattagt
 421 cggctgtctcaggaggcggaaaggaaatcgataacggcagcggaaggctcagcgag
 50 481 ttgacacgtgttttagccgtctcgaagagtatctgcactcgagaaagtagcgttgcgat
 541 ttgcagtcgcttccggtgtctcaccagttactttaataaacgtactgtttaacc

55 Proteína: Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® AAF63437 (SEQ ID NO:3)

MLSMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVK
 PTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSDMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHS
 60 MRSTLESIIYKDMRQCPLLGCSDKSVIS
 RLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK

Secuencia de aminoácidos de IL-10 humana (Núm. de Acceso a la Base de Datos GenBank® P22301.1) (SEQ ID NO:4).
 65 La numeración de los residuos de aminoácidos que se mutan como se describe en la presente descripción se basa en

esta secuencia de aminoácidos, tal que el S en la posición de aminoácido 19 (subrayado en la alineación a continuación) es el número de aminoácido 1.

MHSSALLCCL VLLTGVRASP GQGTQSENSC THFPGNLPNM LRDLRDAFSR
VKTFQMKDQ LDNLLLKESL LEDFKGYLGC QALSEMIQFY LEEVMPQAEN
QDPDIKAHVN SLGENLKT LR LRLRRCHRFL PCENKSKAVE QVKNAFNKLQ
EKGIYKAMSE EDIFINYIEA YMTMKIRN

10 Alineamientos de secuencias

Dos cepas de rhesus son 98 % idénticas - 1 aminoácidos cambia en la secuencia señal. cmvIL-10 de rhesus y humano comparten el 27 % de identidad de secuencia.

15 cmvIL-10 de rhesus e IL-10 de humano son 17 % idénticas
Human cmvIL-10 and IL-10 de humano son 26 % idénticas

	RhCMV68-2	MRRRRRSFGIIIVAG---AIGTLLMMAVVVL S AHDHEHKEVPPACDPVHGNI L AGIFKELRA	57
	RhCMVMU28684	MRRRRGSPDIIVAG---AIGTLLMMAVVVL S AHDHEHKEVPPACDPVHGNI L AGIFKELRA	57
20	huHCMV	-----MLSVMVSSSLVLIVFLGLGASEAKPATTTIKNTKPQRCPED--YATRLQDLRV	52
	huIL10P22301	-----MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTSSENS---CTHFPGNLPNMLRDLRD	46
		: . * . . . : : *	
		34 38	
	RhCMV68-2	TYASIREGLQKKDVTYYTSLFNDRVLHEMLSPMGCRVTNELMEHYLDGVLPRASHLDYDN	117
	RhCMVMU28684	TYASIREGLQKKDVTYYTSLFNERVLHEMLSPMGCRVTNELMEHYLDGVLPRASHLDYDN	117
25	huHCMV	TFHRVKPTLQRED--DYSVWLDTGVVKGCGW--CSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVPYG-	106
	huIL10P22301	AFSRVKTFPFQMKD-QLDNLLLKESLLEDFKGYLGCAQLSEMIQFYLEEVPQAENQDPD-	104
		:: :: :*:* . ..:: . * . . . : : ** : * : . .	
		142 144	
	RhCMV68-2	STLNGLHVFASSMQALYQHMLKCP-ALACTGKTPAWMYFLEVEHKLNPNWRGTAKAAA EAD	176
	RhCMVMU28684	STLNGLHVFASSMQALYQHMLKCP-ALACTGKTPAWMYFLEVEHKLNPNWRGTAKAAA EAD	176
30	huHCMV	-LKTELHSFRSTLESYKDMRQCP-LLCGDKSVISRLSQEAERKSD--NGTRKGL SELD	162
	huIL10P22301	-IKAHVNSLGENLKLTRLRLRRCRHLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQE-KGIYKAM SEFD	162
		:: : . . : : : : : * * * . : : . * : . * * . * *	
		145	
	RhCMV68-2	LLNNYLETFLLQF--- 189	
	RhCMVMU28684	LLNNYLETFLLQF--- 189	
35	huHCMV	TLFSRLEEYLHSRK-- 176	
	huIL10P22301	IFINYIEAYMTMKIRN 178	
		:: . : * :	

Los segmentos de residuos de rhcmvIL-10 42-85, 169-189 están sombreados; las posiciones de los residuos mutados en rhcmvIL-10 R63 (34), Q67 (38), E174 (142), D176 (144) están numeradas (números en negrita sobre las secuencias) de acuerdo con la secuencia de IL-10 humana madura (SEQ ID NO: 4) de manera que S19 (subrayado en la alineación anterior) es el residuo 1.

os segmentos de residuos de hucmvIL-10 39-78, 155-176 están sombreados; las posiciones de los residuos mutados en
45 cmvIL-10 humano K58 (34), Q62 (38), E160 (142), D162 (144) están numeradas (números en negrita sobre las
secuencias) de acuerdo con la secuencia de IL-10 humana madura de manera que S19 (subrayado) es el residuo 1.

Otras posiciones de residuos deseables para las mutaciones, además de las actuales, son el residuo 20 (numeración de secuencias de IL-10 humana madura), que es Ala49 en RhcmvIL-10, y Ala44 en cmvIL-10 humana (numeración de secuencias de IL-10 humana madura).

55 A continuación, se muestran las secuencias de aminoácidos de las proteínas cmvIL-10 humanas (identificadas por el número de acceso a la base de datos GenBank®) que tienen diferentes longitudes, con 3-7 treoninas cerca del extremo N. Estas secuencias se alinean con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 descrita en este documento (número de acceso a la base de datos GenBank® AAF63437) y las regiones de aminoácidos y mutaciones que corresponden a las descritas en este documento para la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 se proporcionan a continuación.

```

5  gb|ABD18482.1|  MLSVMVSSSLVLIIVFFLGASEEAKPAATTTTTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR 60
    AF182315      MLSVMVSSSLVLIIVFFLGASEEAKPA-----TTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR 55
    gb|ABD18476.1|  MLSVMVSSSLVLIIVFFLGASEEAKPAT---TTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR 57
    SEQ ID NO:3     MLSVMVSSSLVLIIVFFLGASEEAKPAT-----TTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR 56
    gb|ACL27109.1|  MLSVMVSSSLVLIIVFFLGASEEAKPA-----TTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR 55
                    *****
                    ***

10  gb|ABD18482.1|  VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRS 120
    AF182315      VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRS 115
    gb|ABD18476.1|  VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRS 117
    SEQ ID NO:3     VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRS 116
    gb|ACL27109.1|  VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRS 115
                    *****

15  gb|ABD18482.1|  TLESIYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLSHRK 180
    AF182315      TLESIYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLSHRK 175
    gb|ABD18476.1|  TLESIYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLSHRK 177
    SEQ ID NO:3     TLESIYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLSHRK 176
    gb|ACL27109.1|  TLESIYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLSHRK 175
                    *****

20  Intervalo 1      Intervalo 2      muts hIL10  maduro  #  34      38      142      144
    gb|ABD18482.1|  43-82      159-180
    AF182315      38-77      154-175
    gb|ABD18476.1|  40-79      156-177
    SEQ ID NO:3     39-78      155-176
    gb|ACL27109.1|  43-82      159-180
                    62      66      164      166
                    57      61      159      161
                    59      63      161      163
                    58      62      160      162
                    62      66      164      166

```

A continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de las proteínas rhcmvIL-10 etiquetadas con His expresadas en células de insecto para la caracterización inicial y la inmunización.

AF1 secuencia señal subrayada, sitio FXa = IEGR. Cortes de proteasas a la derecha de la R
Las inmunizaciones se realizaron con pMTA-rhcmvIL-10FXH con las mutaciones apropiadas.

```

35  pAHF-rhcmvIL10  MRPTLLWSLLLLLVFAAAAAAPPHHHHHSDIEGRAHDHEHKEVPPACDPVHGNLAGIF 60
    pMTA-rhcmvIL10FXH MRPTLLWSLLLLLVFAAAAAA-----HDHEHKEVPPACDPVHGNLAGIF 45
    rhcmvIL10WT 68-2 MRRRRRSFGIIVAGAIGTLLMMAVVVLS-----AHDHEHKEVPPACDPVHGNLAGIF 52
                    **          :: *...: *****

40  pAHF-rhcmvIL10  KELRATYASIREGLQKKDVTYYTSLFNDRVLHEMLSPMGCRVTNELMEHYLDGVLPRASH 120
    pMTA-rhcmvIL10FXH KELRATYASIREGLQKKDVTYYTSLFNDRVLHEMLSPMGCRVTNELMEHYLDGVLPRASH 105
    rhcmvIL10WT 68-2 KELRATYASIREGLQKKDVTYYTSLFNDRVLHEMLSPMGCRVTNELMEHYLDGVLPRASH 112
                    *****

45  pAHF-rhcmvIL10  LDYDNSTLNLGHVFASSMQALYQHMLKCPALACTGKTPAWMYFLEVEHKLNPNWRGTAKAA 180
    pMTA-rhcmvIL10FXH LDYDNSTLNLGHVFASSMQALYQHMLKCPALACTGKTPAWMYFLEVEHKLNPNWRGTAKAA 165
    rhcmvIL10WT 68-2 LDYDNSTLNLGHVFASSMQALYQHMLKCPALACTGKTPAWMYFLEVEHKLNPNWRGTAKAA 172
                    *****

    pAHF-rhcmvIL10  AEADLLNLYLETFLQF----- 197
    pMTA-rhcmvIL10FXH AEADLLNLYLETFLQFSIEGRTGHHHHH 195
    rhcmvIL10WT 68-2 AEADLLNLYLETFLQF----- 189
                    *****

```

Tabla 1

Residuo de Aminoácido	Abreviatura	
	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico (Aspartato)	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico (Glutamato)	Glu	E

Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	S
Valina	Val	V

Tabla 2

Residuo de Aminoácido Modificado	Abreviatura
Derivados de Residuo de Aminoácido	
ácido 2-Aminoadípico	Aad
ácido 3-Aminoadípico	bAad
beta-Alanina, ácido beta-Aminopropiónico	bAla
ácido 2-Aminobutírico	Abu
ácido 4-Aminobutírico, ácido Piperidínico	4Abu
ácido 6-Aminocaproico	Acp
ácido 2-Aminoheptanoico	Ahe
ácido 2-Aminoisobutírico	Aib
ácido 3-Aminoisobutírico	bAib
ácido 2-Aminopimélico	Apm
t-butilalanina	t-BuA
Citrulina	Cit
Ciclohexilalanina	Cha
ácido 2,4-Diaminobutírico	Dbu
Desmosina	Des
ácido 2,2'-Diaminopimélico	Dpm
ácido 2,3-Diaminopropiónico	Dpr
N-Etilglicina	EtGly
N-Etilasparagina	EtAsn
Homoarginina	hArg
Homocisteína	hCys
Homoserina	hSer
Hidroxilisina	Hil

Alo-Hidroxilisina	aHil
3-Hidroxiprolina	3Hyp
4-Hidroxiprolina	4Hyp
Isodesmosina	Ide
alo-Isoleucina	alle
Metionina sulfóxido	MSO
N-Metilglicina, sarcosina	MeGly
N-Metilisoleucina	Melle
6-N-Metilisina	MeLys
N-Metilvalina	MeVal
2-Naftilalanina	2-Nal
Norvalina	Nva
Norleucina	Nle
Ornitina	Orn
4-Clorofenilalanina	Phe(4-Cl)
2-Fluorofenilalanina	Phe(2-F)
3-Fluorofenilalanina	Phe(3-F)
4-Fluorofenilalanina	Phe(4-F)
Fenilglicina	Phg
Beta-2-tienilalanina	Thi

Tabla 3. Espectrometría de Masas del Análisis de RhCMVIL-10

Proteína	Masa Calculada	Masa Observada	Diferencia
RhCMVIL- 10FxaH6*	20,755**	20,762	7
RhCMVIL- 10FxaH6* + PNGasa	19,717	19,724	7

* secuencia C-terminal =SIEGRTGHHHHH,** masa de la proteína + 1038 correspondiente a N-glicano

Tabla 4. Esquema de Inmunización de rhcmvIL-10 M1 y M2

SEMANA	Inmunógeno	cantidad	ruta		cantidad	ruta	# de animales	Mutante
0	ADN	150µg	IM	&	50µg	ID	3	M1
"	"	"	"	&	"	"	4	M2
4	ADN	150µg	IM	&	50µg	ID	3	M1
"	"	"	"	&	"	"	4	M2
8	ADN	150µg	IM	&	50µg	ID	3	M1
"	"	"	"	&	"	"	4	M2
14	Proteína	50µg	IM				3	M1
"	"	"	"				3*	M2
19	Proteína	50µg	IM				3	M1
"	"	"	"				3*	M2

IM = Intramuscular, ID=Intradermal, *=4^{to} animal inmunizado sólo con ADN de M2

Tabla 5. Detección de RhCMV en hisopos orales y muestras de orina después de la inoculación con RhCMV en la semana 34

	Hisopos Orales	Semanas después del Desafío con RhCMV											Área Bajo la curva	
		34	35	36	37	48	59	40	41	42	44	46		
CONTROLES	Mmu 22	0	0	0	0	0	0	0	9,149	15,176	0	1,567	33,480	
	Mmu 61	0	0	0	0	0	0	0	29,709	45,609	5,151,941	526,527	10,928,532	
	Mmu 83	0	0	0	0	0	0	9,380	44,703	11,106	267,843	124,704	731,132	
	Mmu 09	0	0	0	0	0	0	0	7,311	69,950	70,532	84,309	337,509	
	Mmu 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
VACUNADOS	Mmu 81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35359	35,359	
	Mmu 66	0	0	0	0	0	0	0	37293	0	0	0	37,293	
	Mmu 86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Semanas después del Desafío con RhCMV											Área bajo la curva	
	Orina	34	35	36	37	48	59	40	41	42	44	46		
CONTROLES	Mmu 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,383	11,383	
	Mmu 61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,356	1,152	13,864	
	Mmu 83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	184	184	
	Mmu 09	0	0	0	0	0	0	590	581	12,226	572	1,528	22,181	
	Mmu 19	0	0	0	0	2,127	0	0	12,100	0	1,798	2,301	20,125	
VACUNADOS	Mmu 81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mmu 66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mmu 86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		# de copias de genoma de RhCMV/ml de fluido												

Tabla 6

Saliva	RhCMV R-T PCR; rhcmvIL-10 NAb; RhCMV NAb
PBMC	RhCMV & rhcmvIL-10 CMI; ELISPOT de células B
Plasma	RhCMV R-T PCR; rhcmvIL-10 & RhCMV NAb; RhCMV ELISA
Orina	RhCMV R-T PCR
R-T: tiempo real; CMI: inmunidad mediada por células;	

Tabla 7: Listado parcial de criterios de resultados

1. NAb contra rhcmvIL-10 en plasma versus eliminación pre-Vx
2. NAb contra rhcmvIL-10 en saliva versus eliminación pre-Vx
3. NAb contra RhCMV en plasma versus eliminación pre-Vx
4. NAb contra rhcmvIL-10 en plasma versus saliva
5. rhcmvIL-10 & RhCMV CMI versus eliminación Pre-Vx
6. NAb contra rhcmvIL-10 Pre-Vx, Peri-Vx, Post-Vx
7. Eliminación Pre-Vx, Peri-Vx, Post-Vx
8. CMI Pre-Vx, Peri-Vx, Post-Vx
Eliminación: Frecuencia y AUC; Pre-Vx: semanas 1-12; Peri-Vx: semanas 13-24; Post-Vx: semanas 25-36

Reivindicaciones

1. Una proteína IL-10 de citomegalovirus seleccionada de:
(i) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:3, o que consiste en la secuencia de aminoácidos

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPAATTTTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRV
TFHRVKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTE
LHSMRSTLESYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEE
YLHSRK, O

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRV
KPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
STLESYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSR
K, O

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFH
RKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSM
RSTLESYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHS
RK, o

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRV
KPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
STLESYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSR
K,

o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de K58, Q62, E160 y D162, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:3;

(ii) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de R63, Q67, E174 y D176, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:1, preferentemente por una sustitución de aminoácido en uno o más de Q67R, R63E, E174Q y D176H, más preferentemente por sustituciones de aminoácidos en Q67R y D176H o por sustituciones de aminoácidos en E174Q y D176H, en donde la sustitución de aminoácido(s) resulta(n) en un fenotipo de unión reducida a una proteína receptora de interleucina 10 (IL-10) y que retiene la inmunogenicidad en comparación con una proteína IL-10 de citomegalovirus que carece dicha(s) sustitución(ones).

2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-10 de citomegalovirus de la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2.
4. Una composición que comprende la proteína IL-10 de citomegalovirus de la reivindicación 1 o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de la reivindicación 3, en un portador aceptable farmacéuticamente.
5. La proteína IL-10 de citomegalovirus de la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, el vector de la reivindicación 3 y/o la composición de la reivindicación 4, en cualquier combinación, para su uso en tratar una infección por citomegalovirus en el sujeto.
6. La proteína IL-10 de citomegalovirus de la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, el vector de la reivindicación 3 y/o la composición de la reivindicación 5, en cualquier combinación, para su uso en prevenir o mejorar una infección primaria de citomegalovirus.
7. La proteína IL-10 de citomegalovirus de la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, el vector de la reivindicación 3 y/o la composición de la reivindicación 4, en cualquier combinación, para su uso en reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un receptor de trasplante o para reducir el riesgo de infección por citomegalovirus en un sujeto inmunocomprometido o inmunodeprimido.
8. Un anticuerpo neutralizante específicamente reactivo contra una proteína IL-10 de citomegalovirus seleccionado de:
(i) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:3, o que consiste en la secuencia de aminoácidos

5 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPAATTTTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRV
 TFHRVKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTE
 LHSMRSTLESYKDMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEE
 YLHSRK, O
 10 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRV
 KPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
 STLESYKDMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSR
 K, O
 15 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHR
 VKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSM
 RSTLESYKDMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHS
 RK, o
 20 MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRV
 KPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCGWCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMR
 STLESYKDMRQCPLLGC GDKSVISRLSQAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSR
 K

25 o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de K58, Q62, E160 y D162, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:3;
 30 (ii) una proteína IL-10 de citomegalovirus como se representa en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2 o un homólogo de esta que tiene al menos 90 % de identidad con la misma que se caracteriza por una sustitución de aminoácido en uno o más de R63, Q67, E174 y D176, en donde la numeración es de acuerdo con la SEQ ID NO:1, preferentemente por una sustitución de aminoácido en uno o más de Q67R, R63E, E174Q y D176H, más preferentemente por sustituciones de aminoácidos en Q67R y D176H o por sustituciones de aminoácidos en E174Q y D176H.

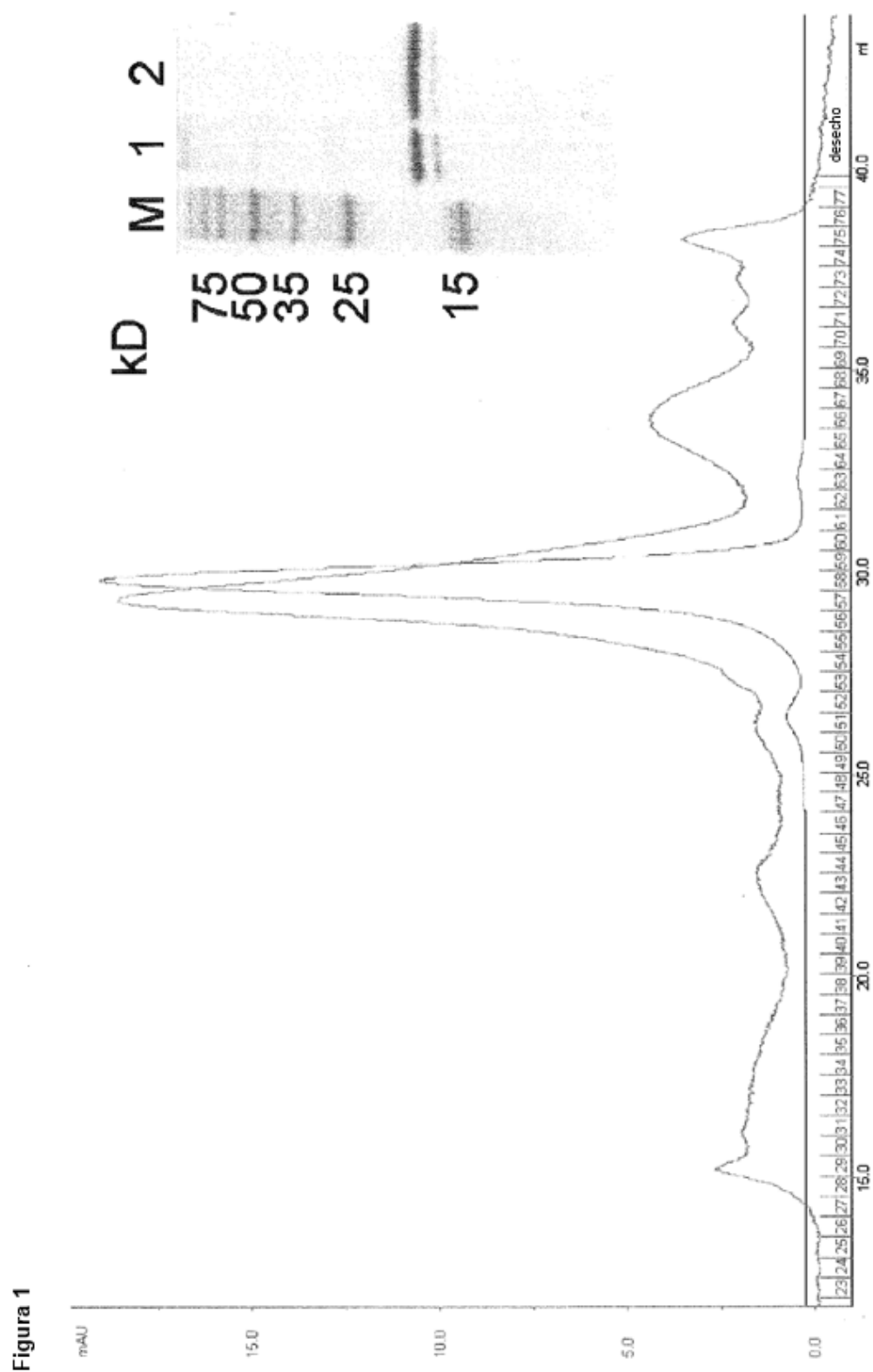
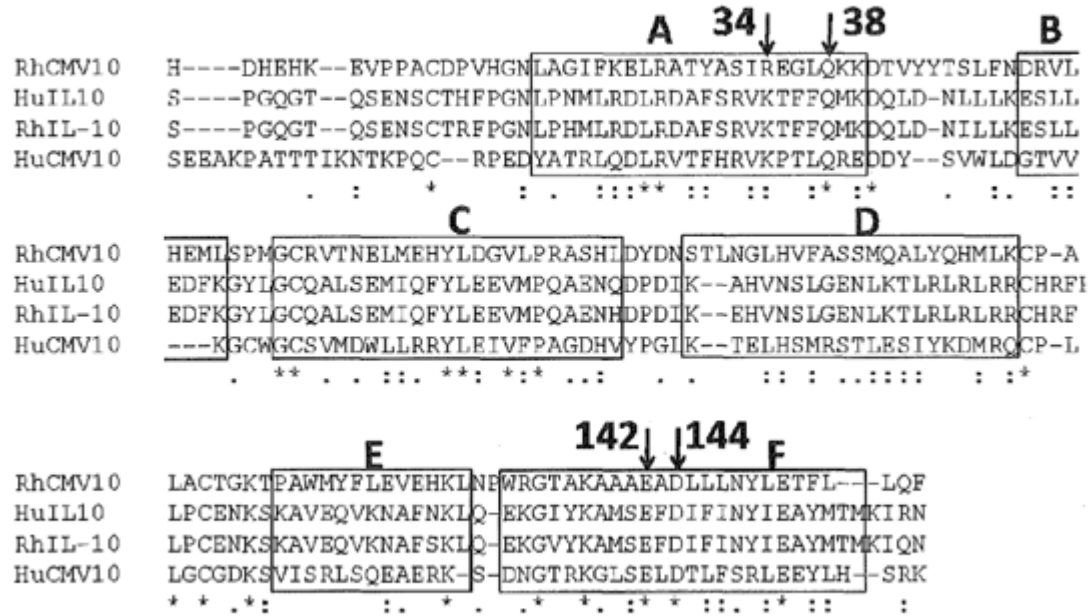


Figura 2

A.



B.

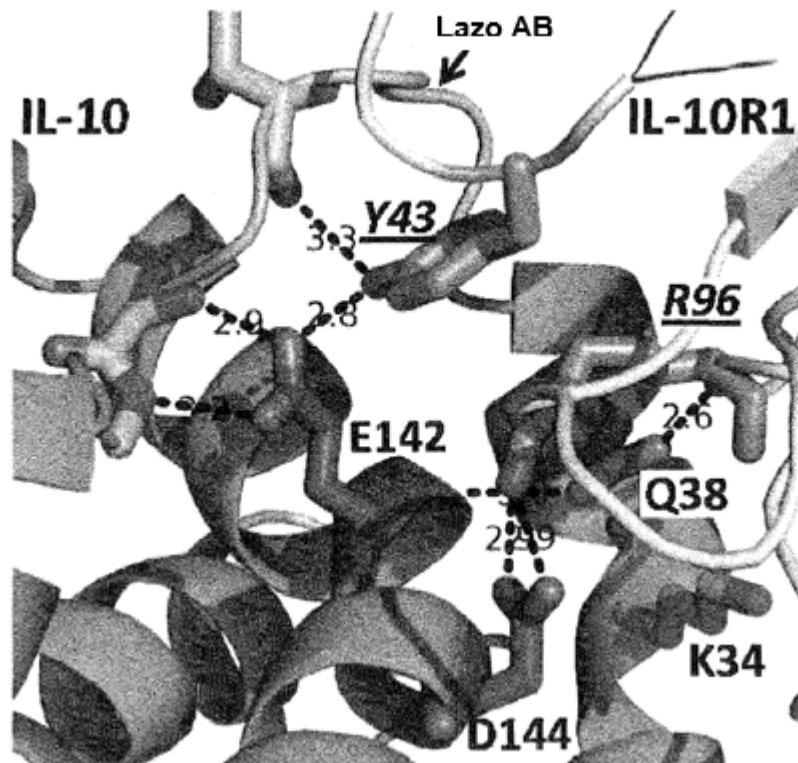


Figura 3

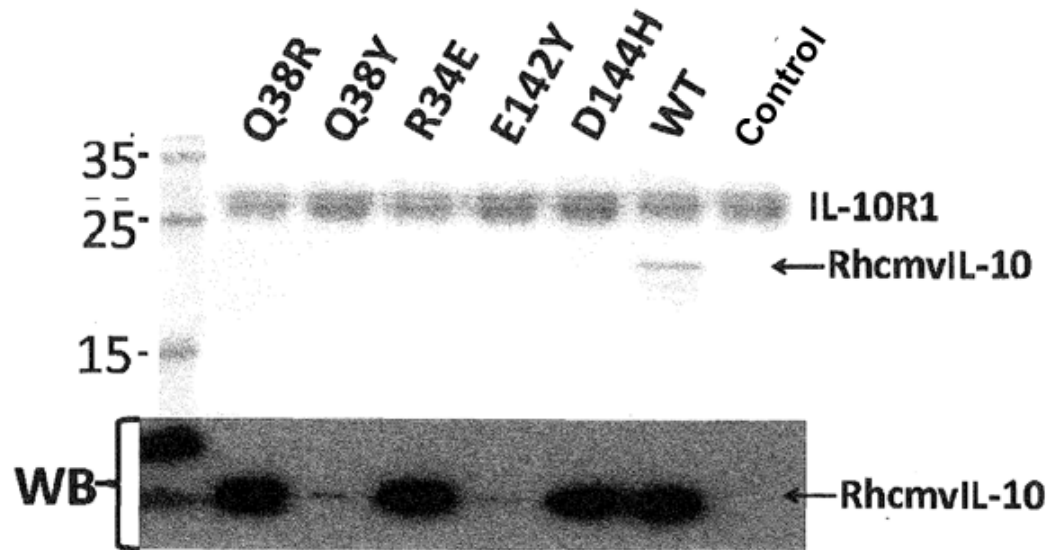
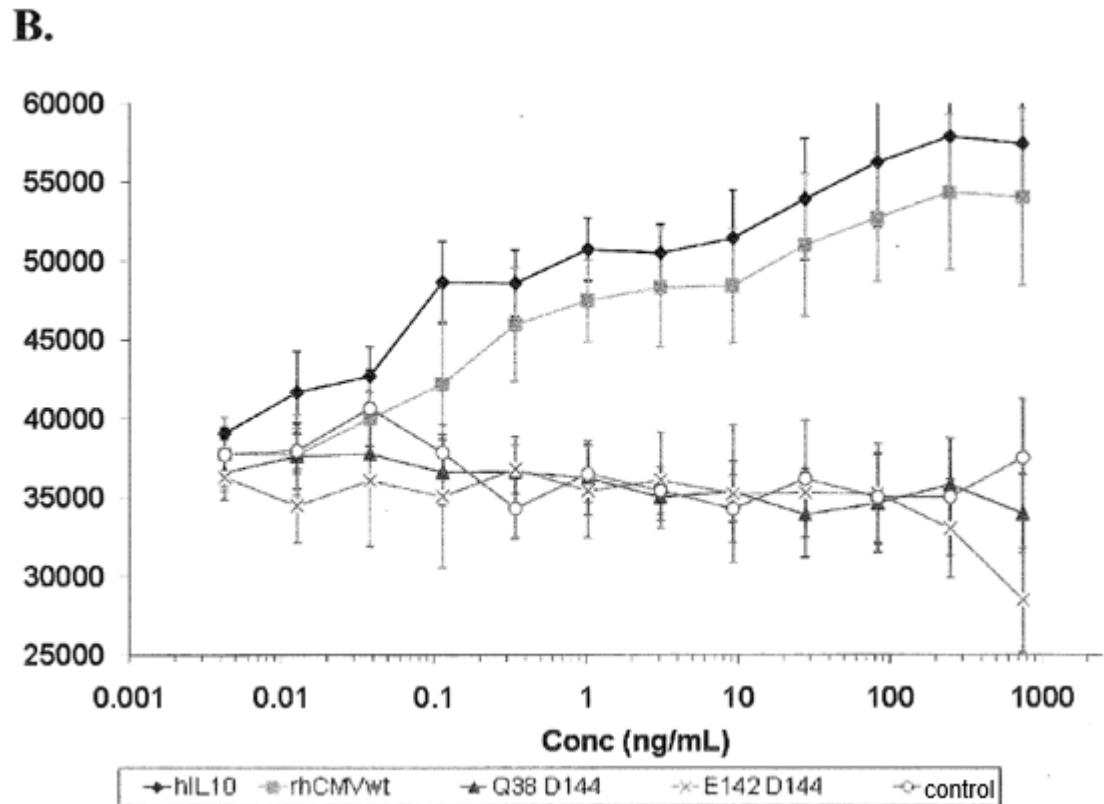
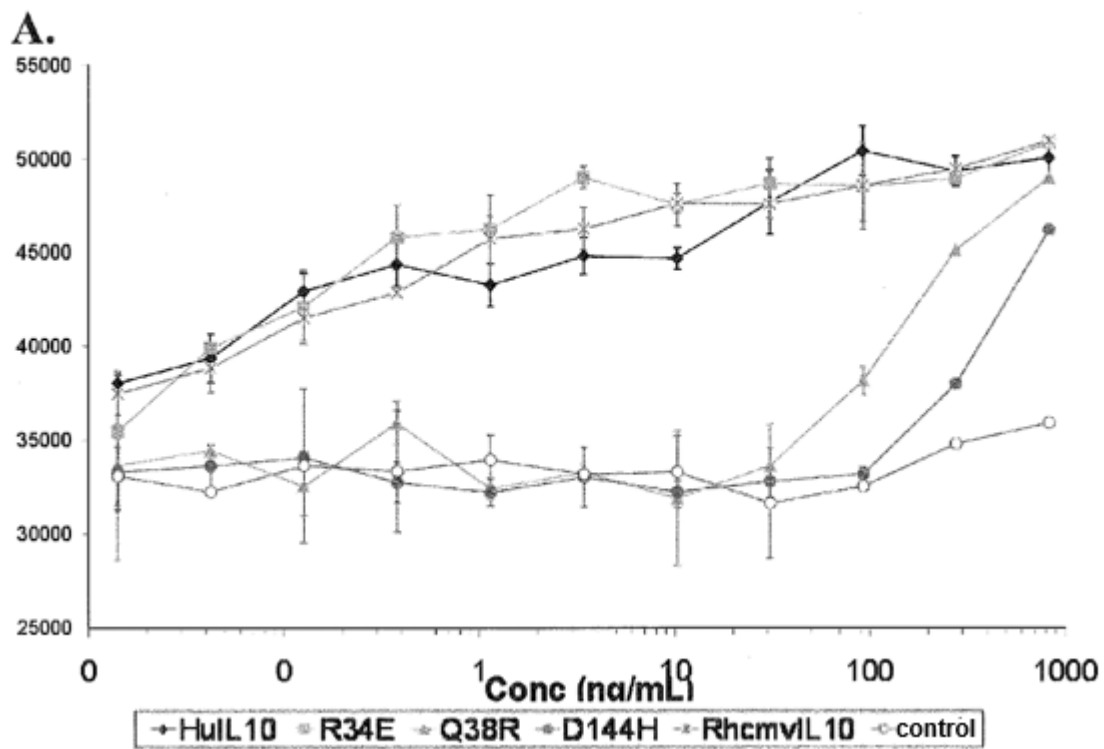
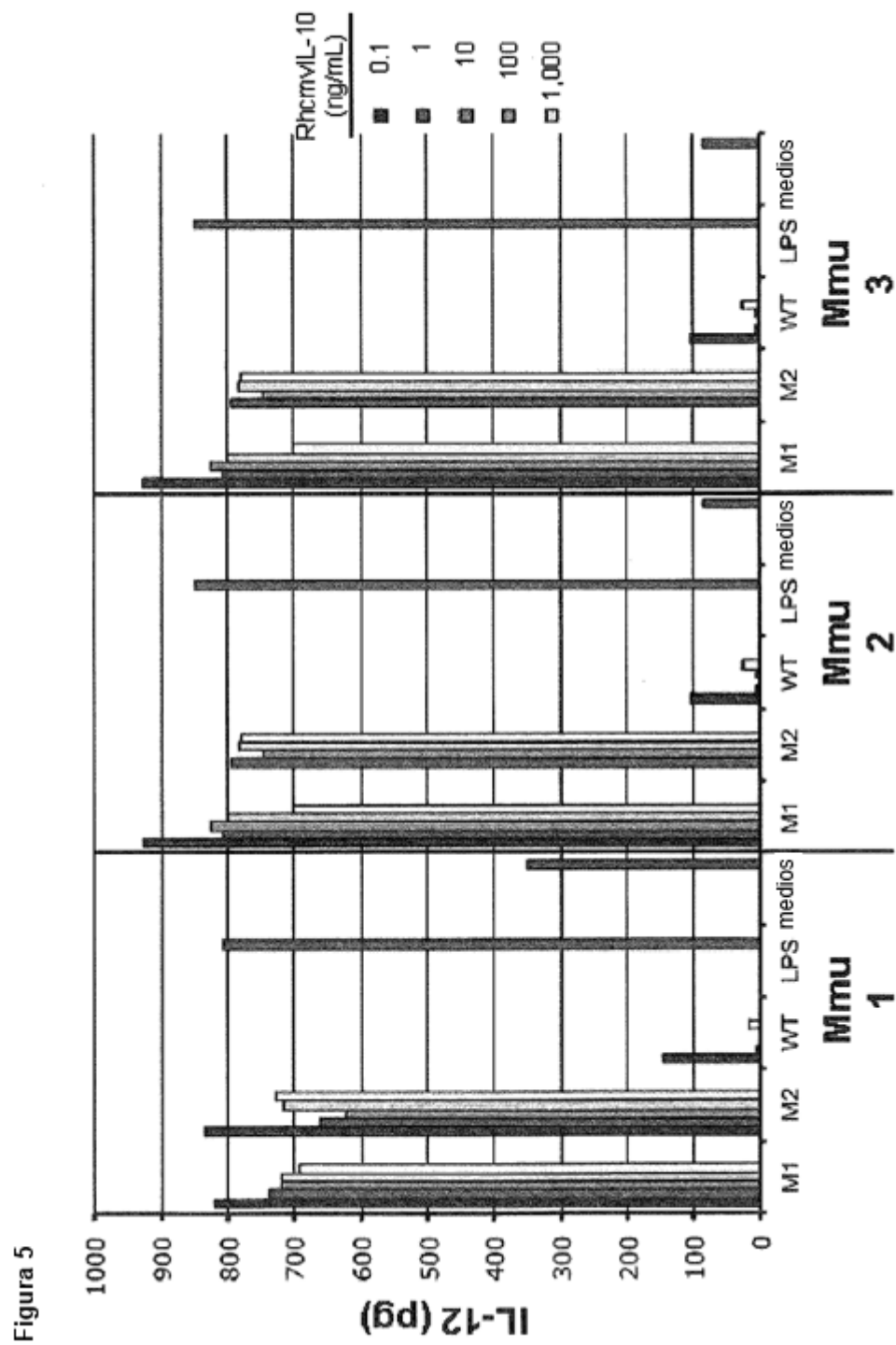


Figura 4





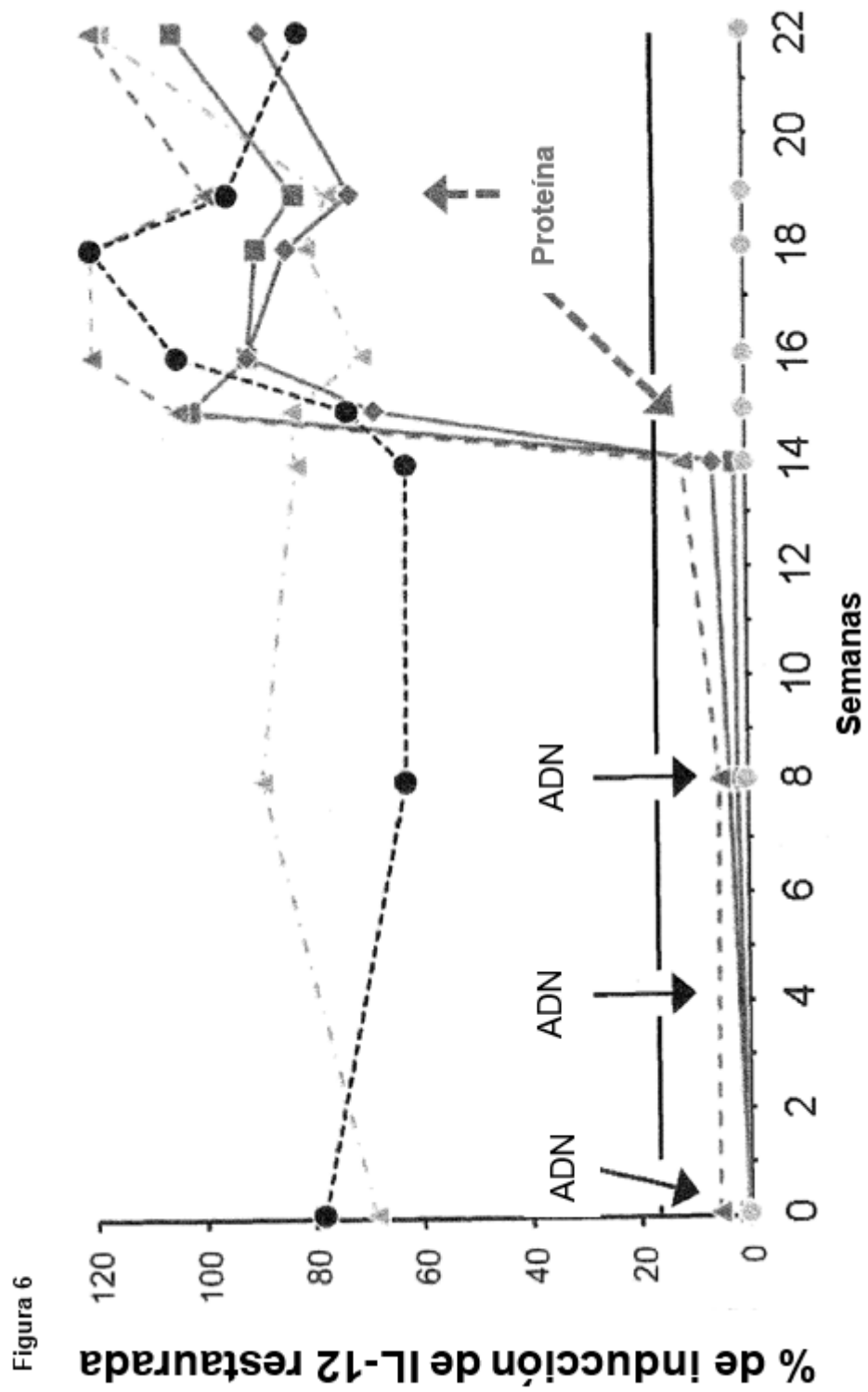


Figura 7

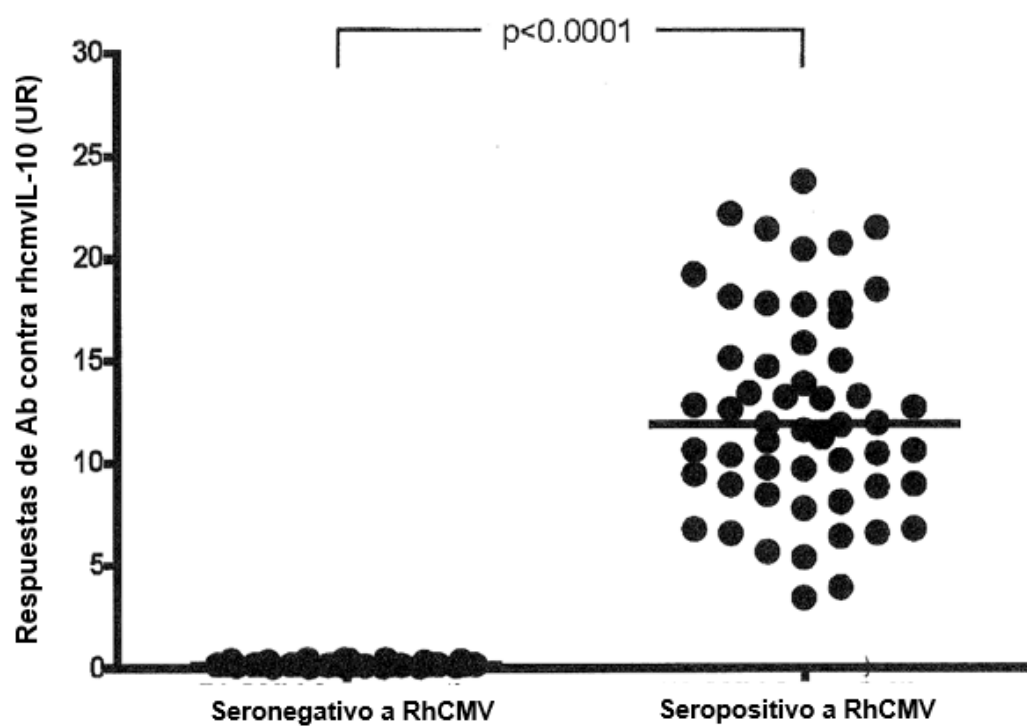


Figura 8

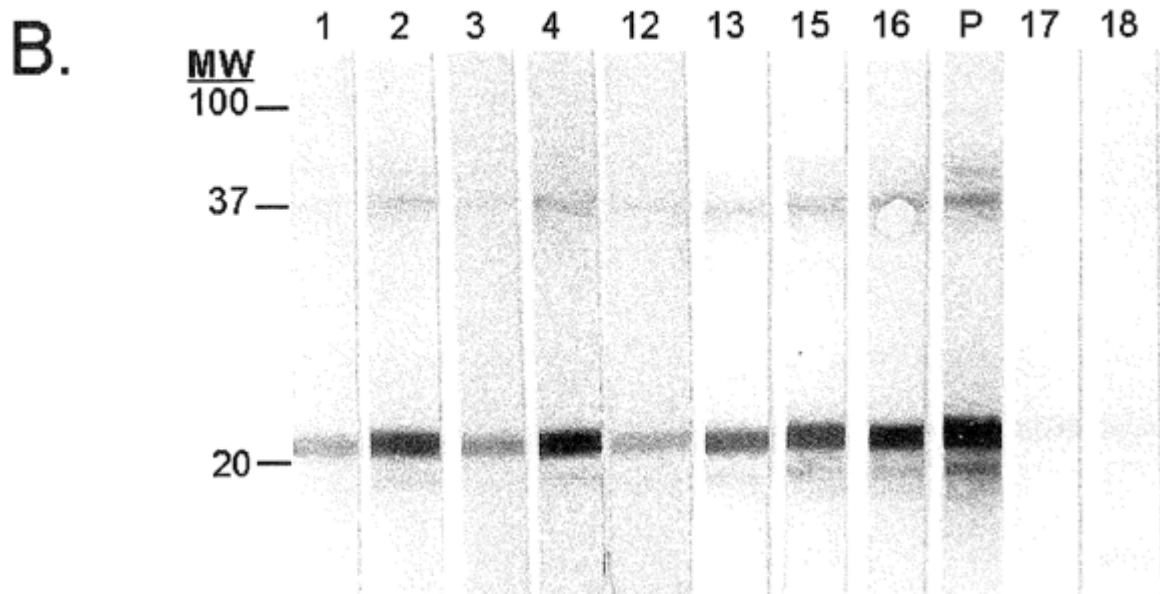
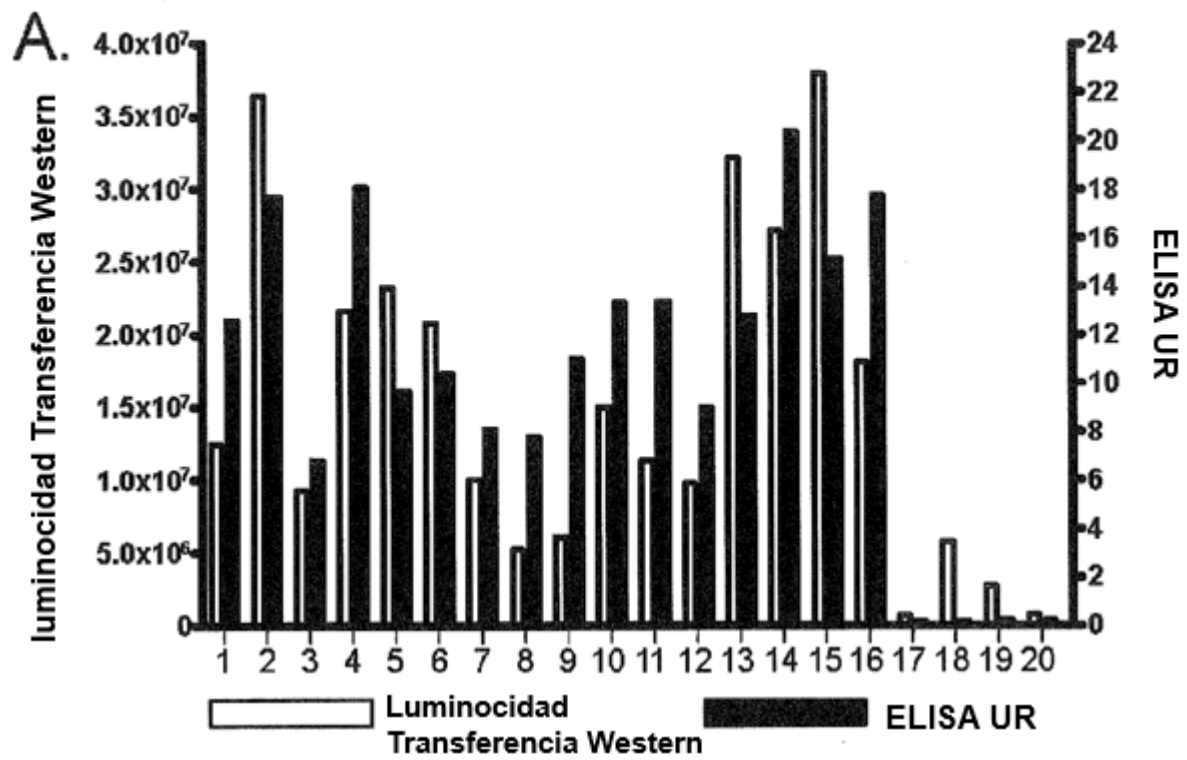


Figura 9

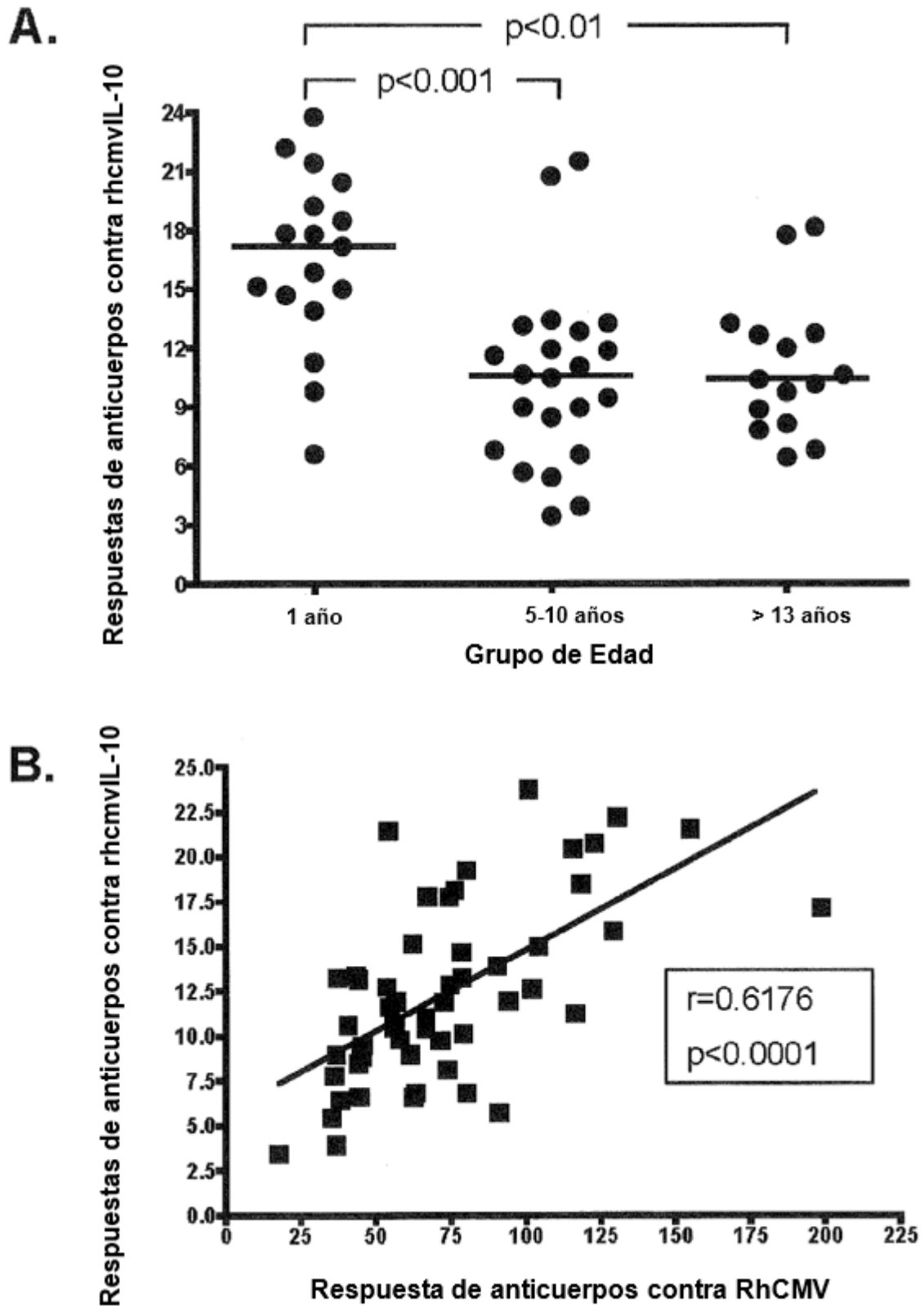


Figura 10

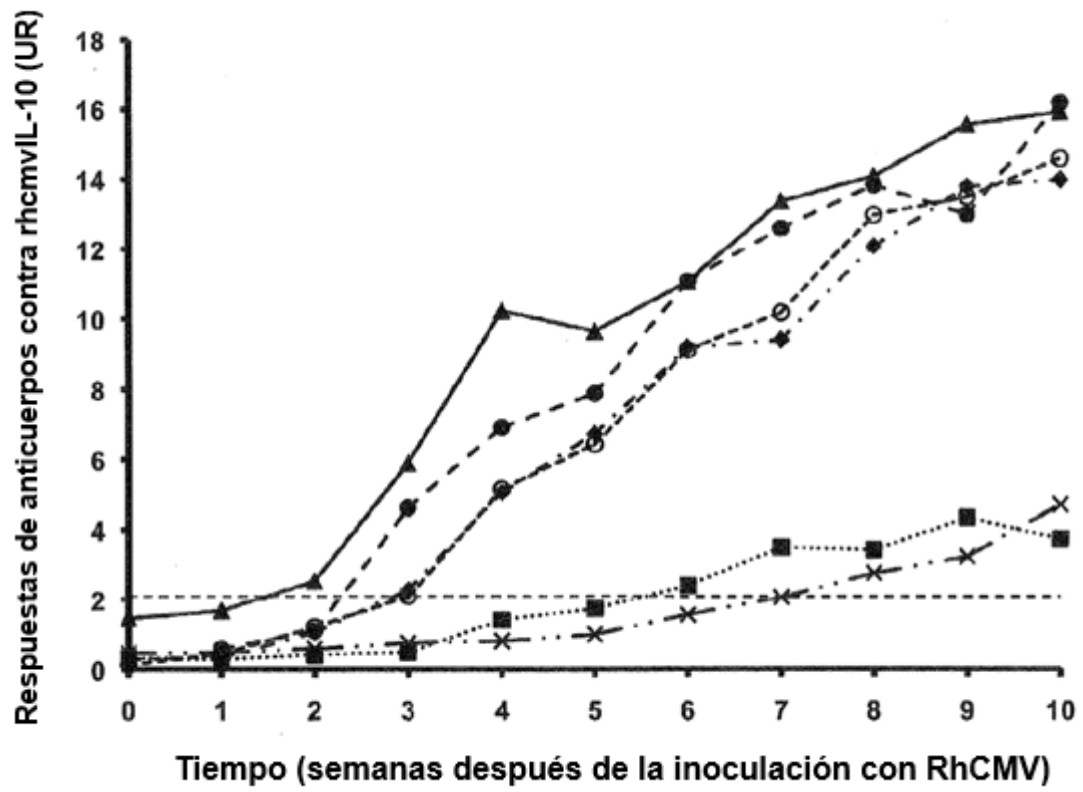


Figura 11

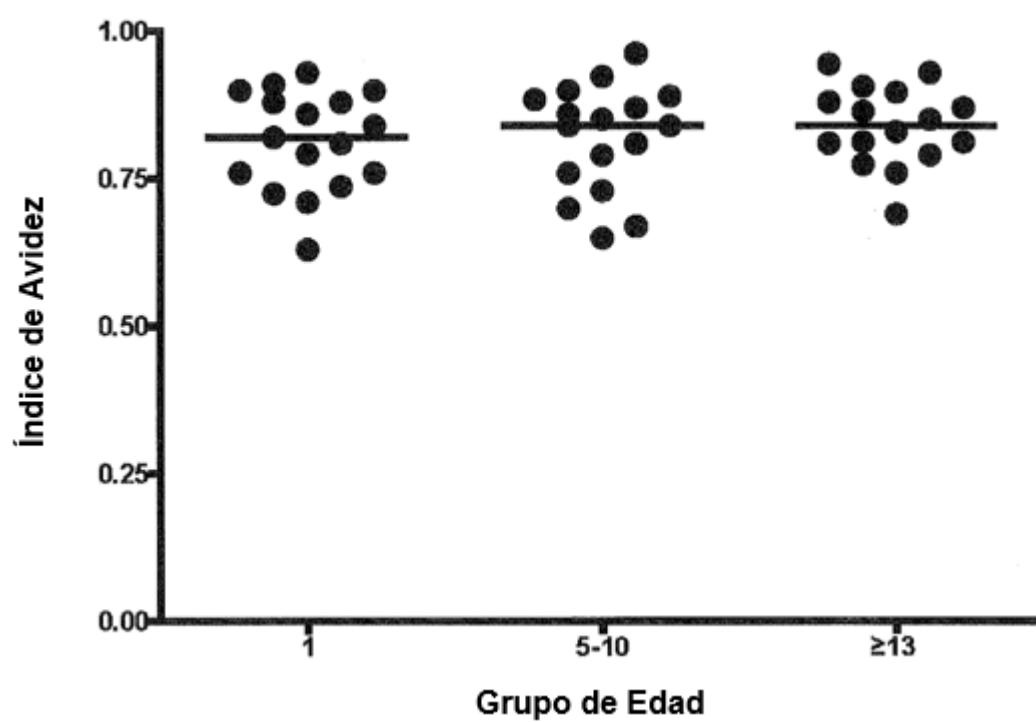
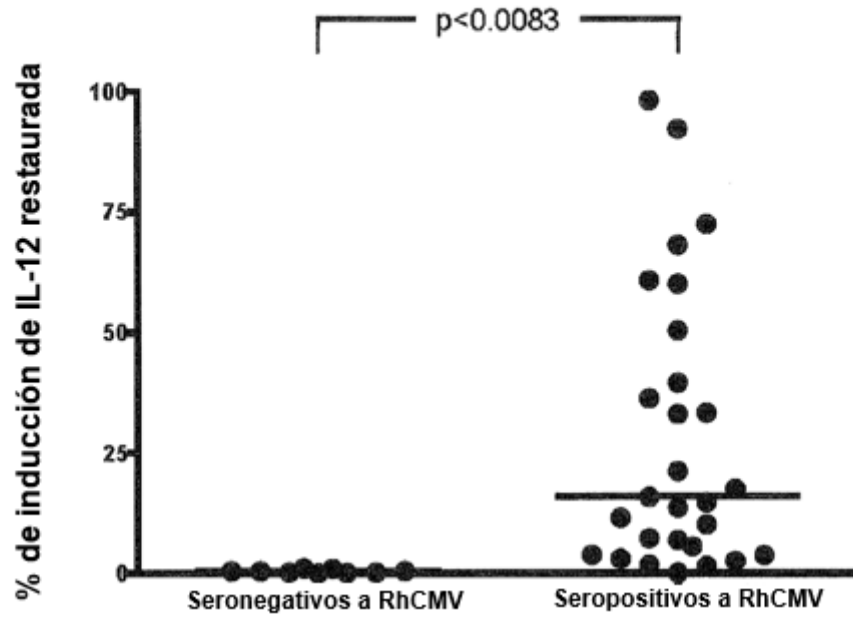


Figura 12

A.



B.

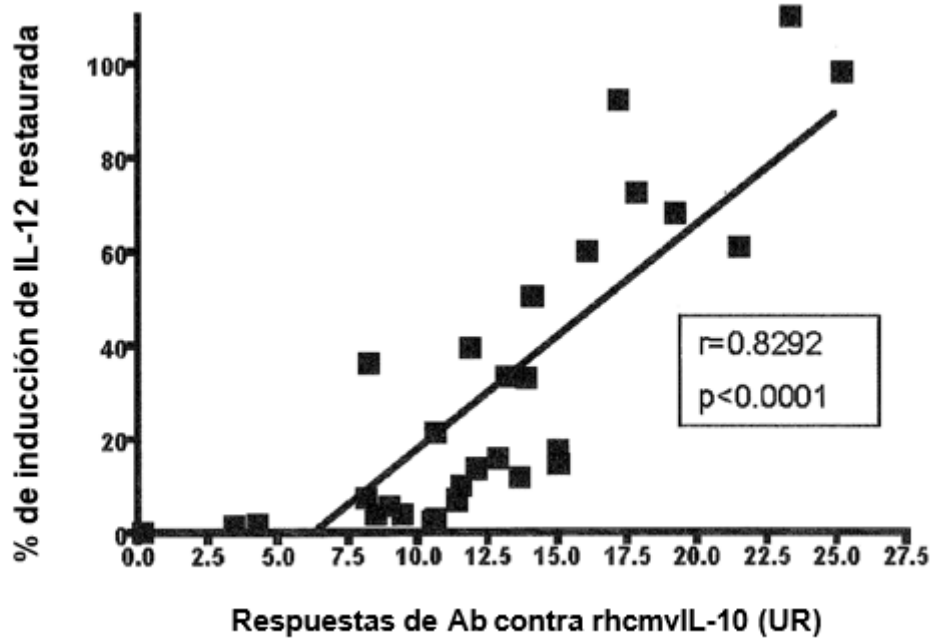


Figura 13

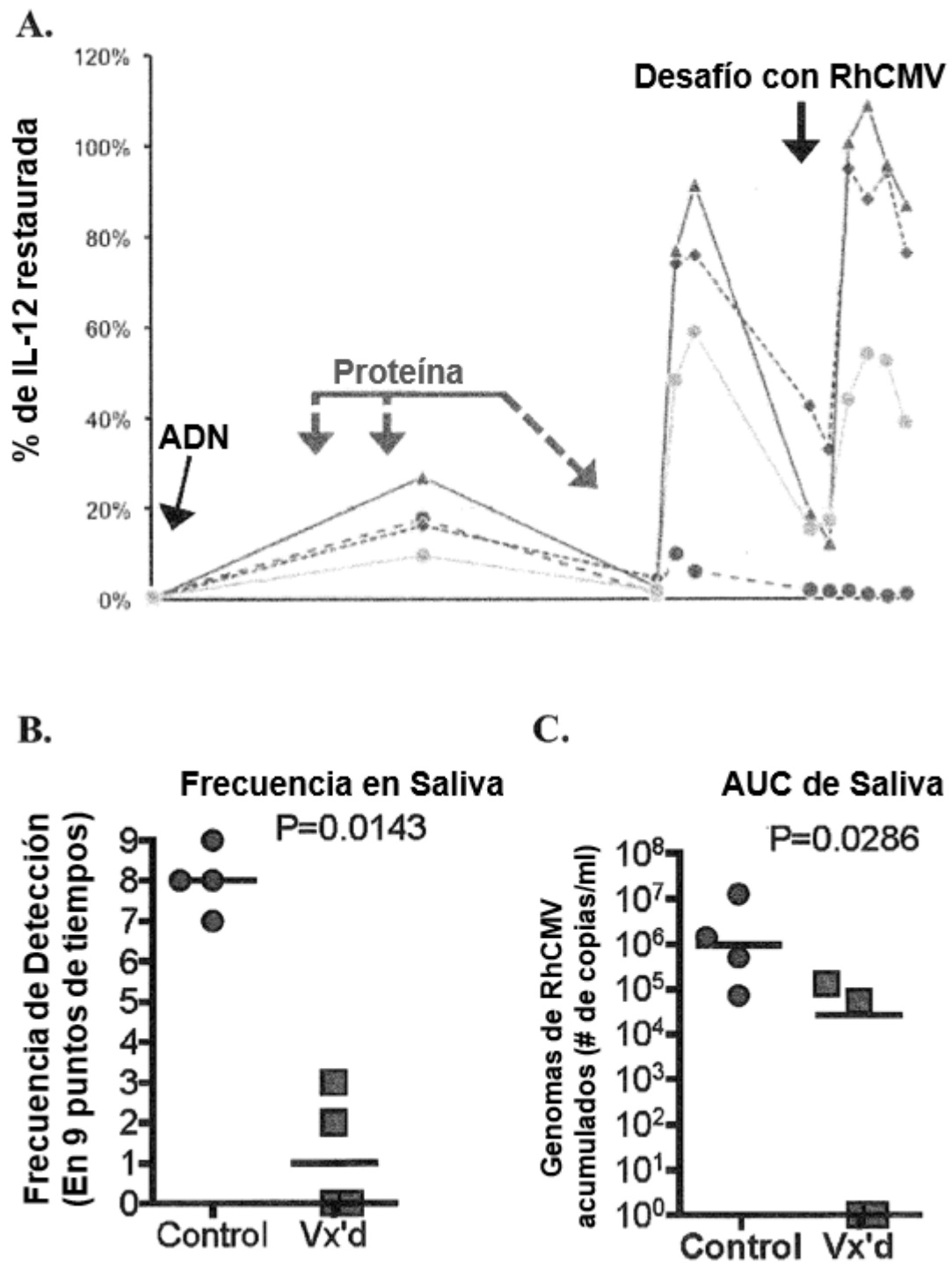
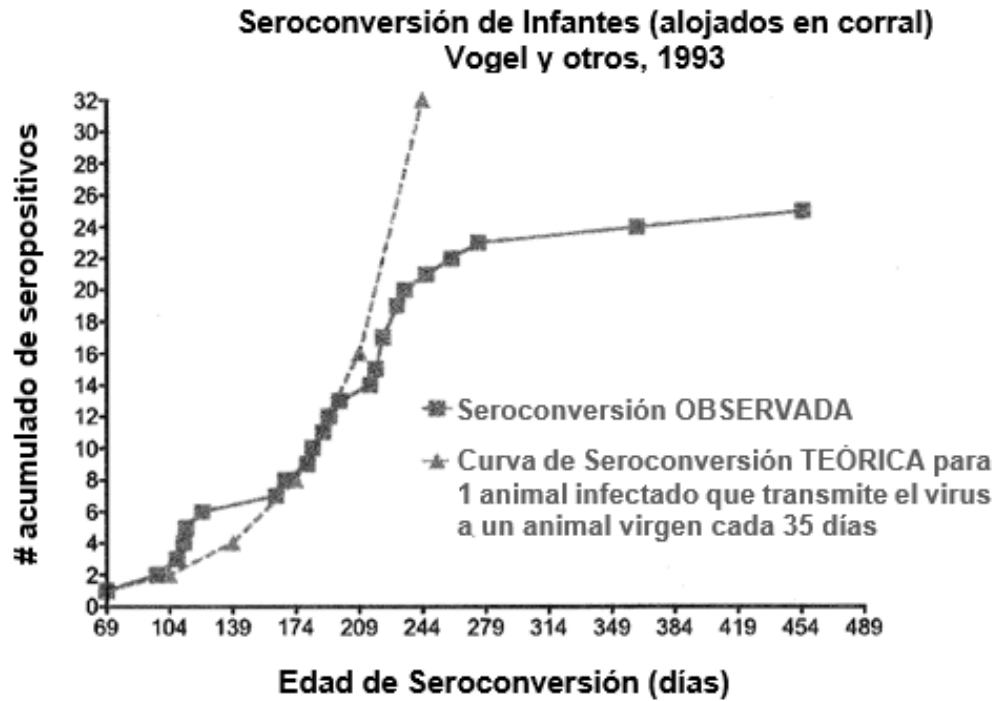


Figura 14

A.



B.

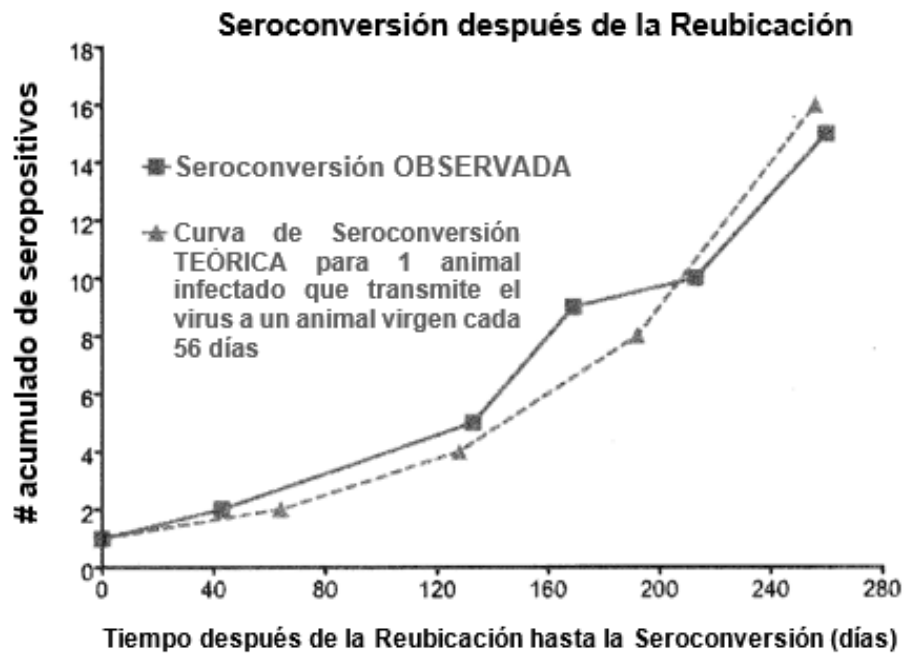
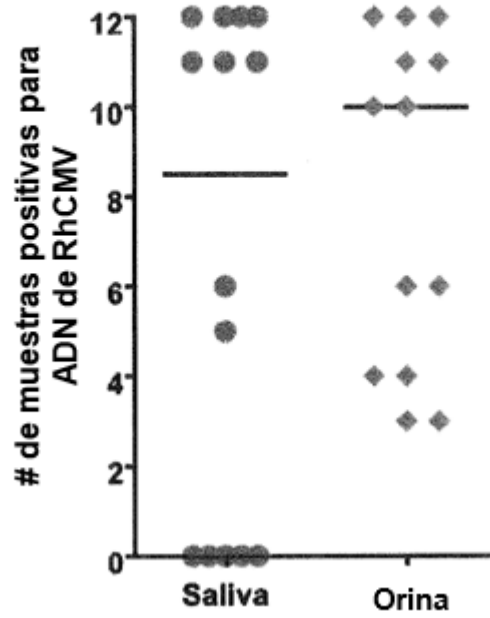


Figura 15

A.



B.

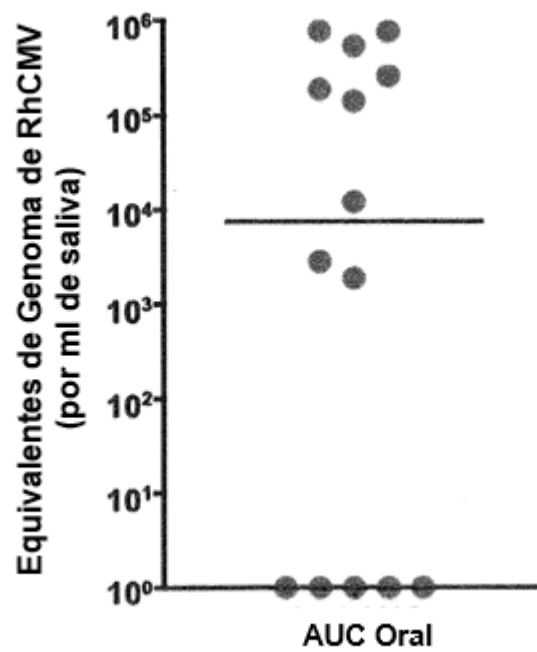


Figura 16

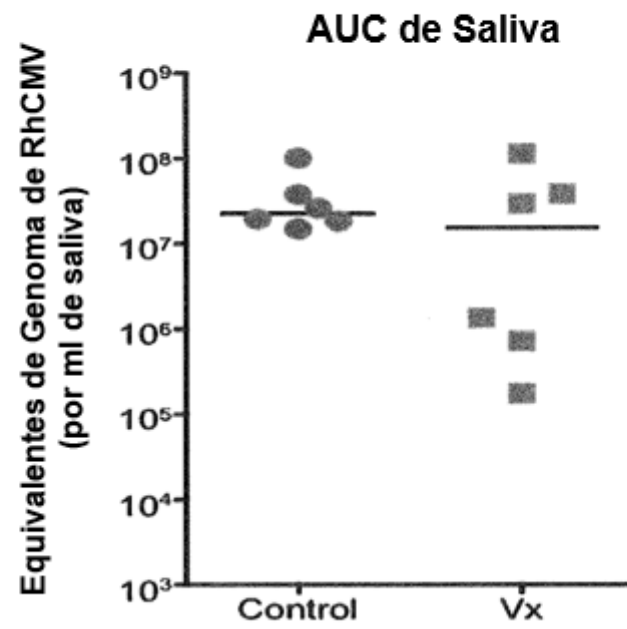


Figura 17A

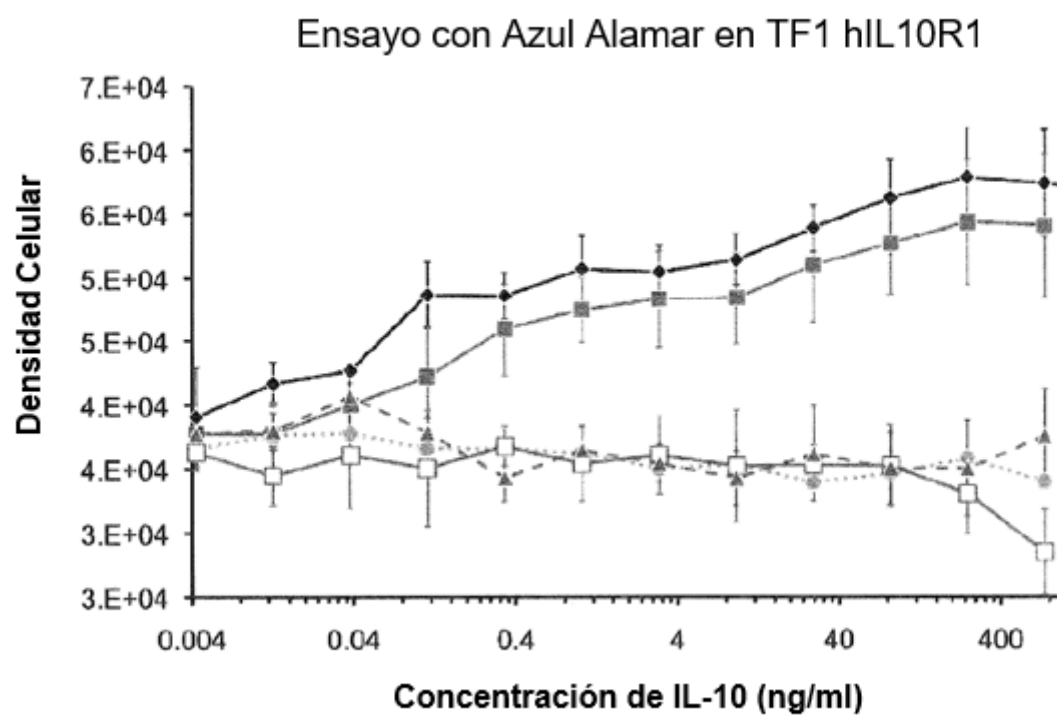


Figura 17B

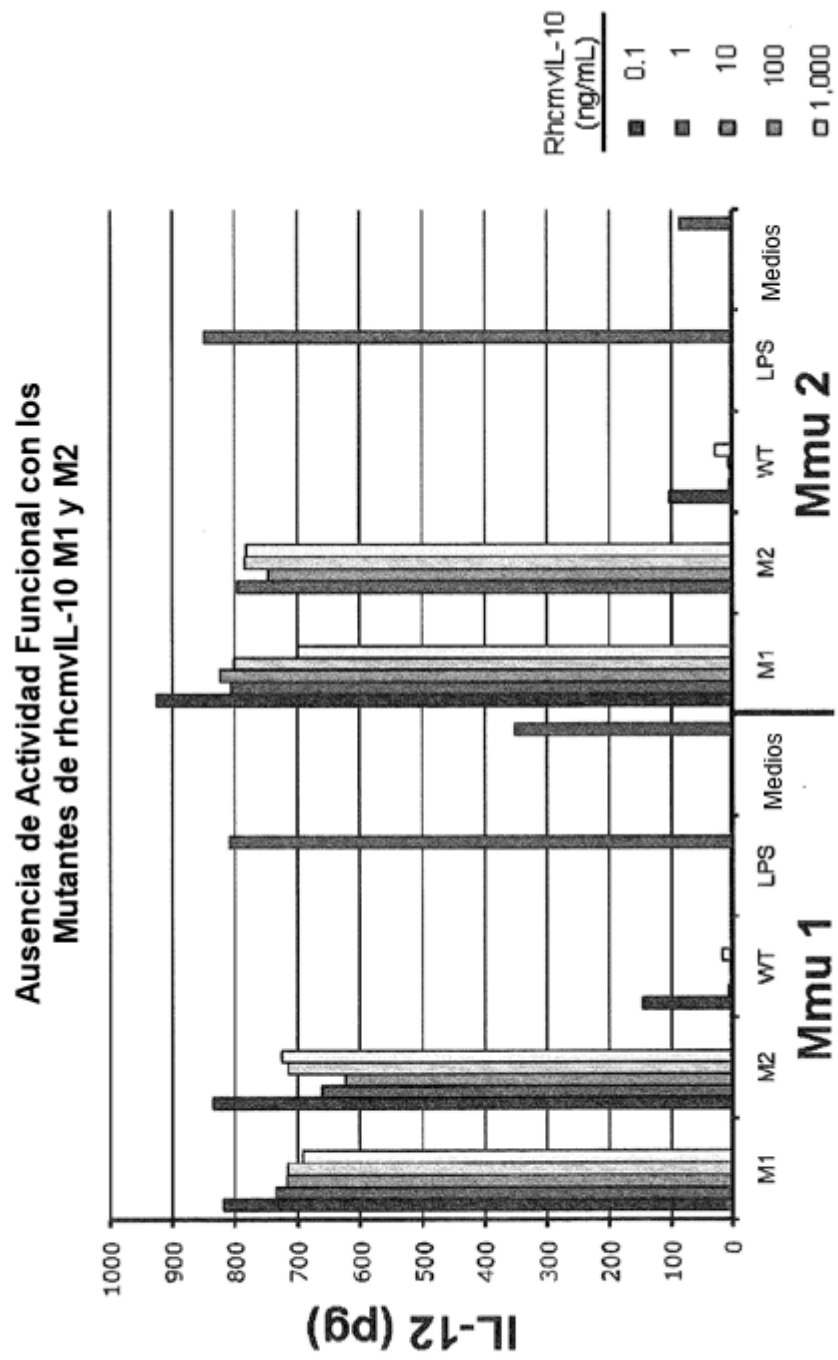


Figura 18

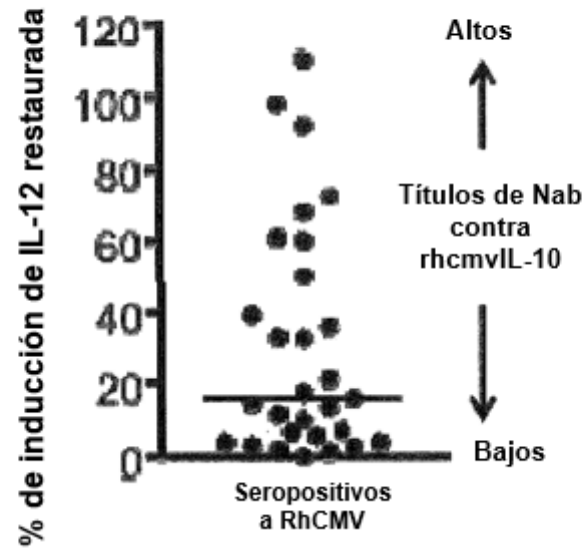


Figura 19

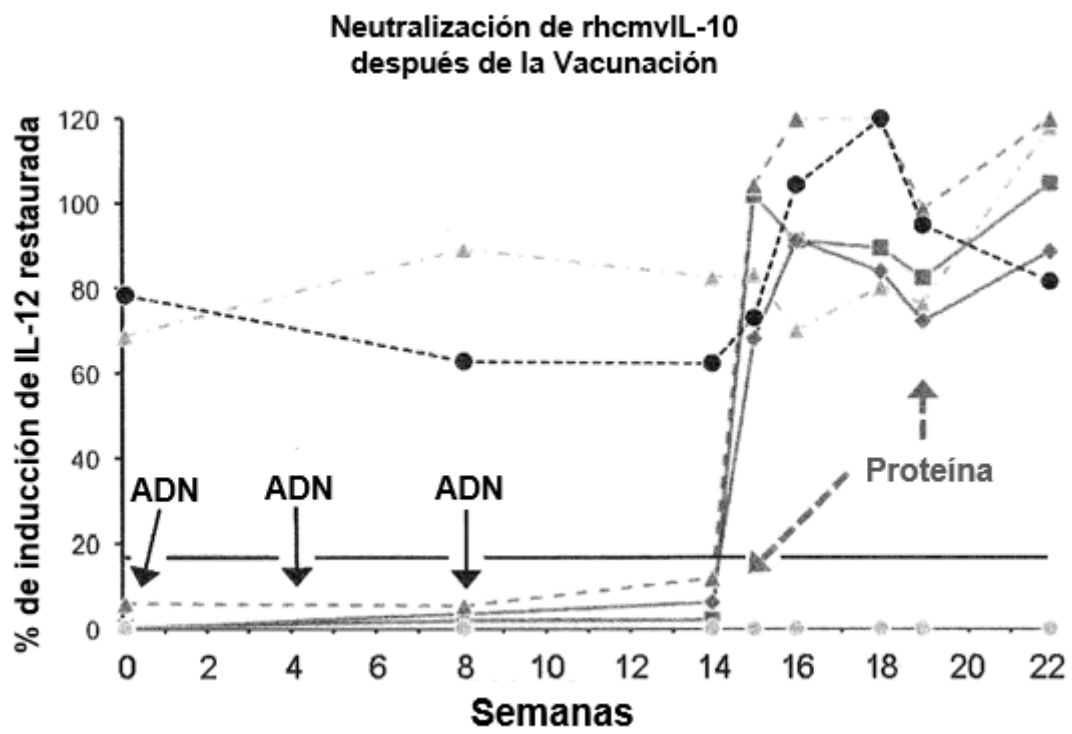
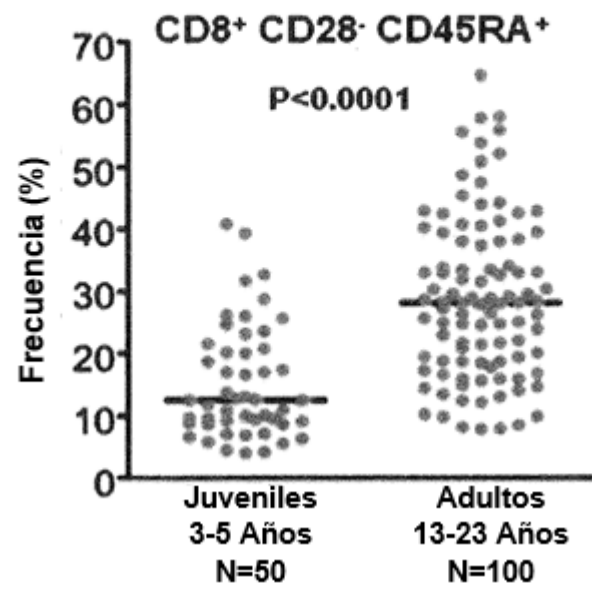


Figura 20



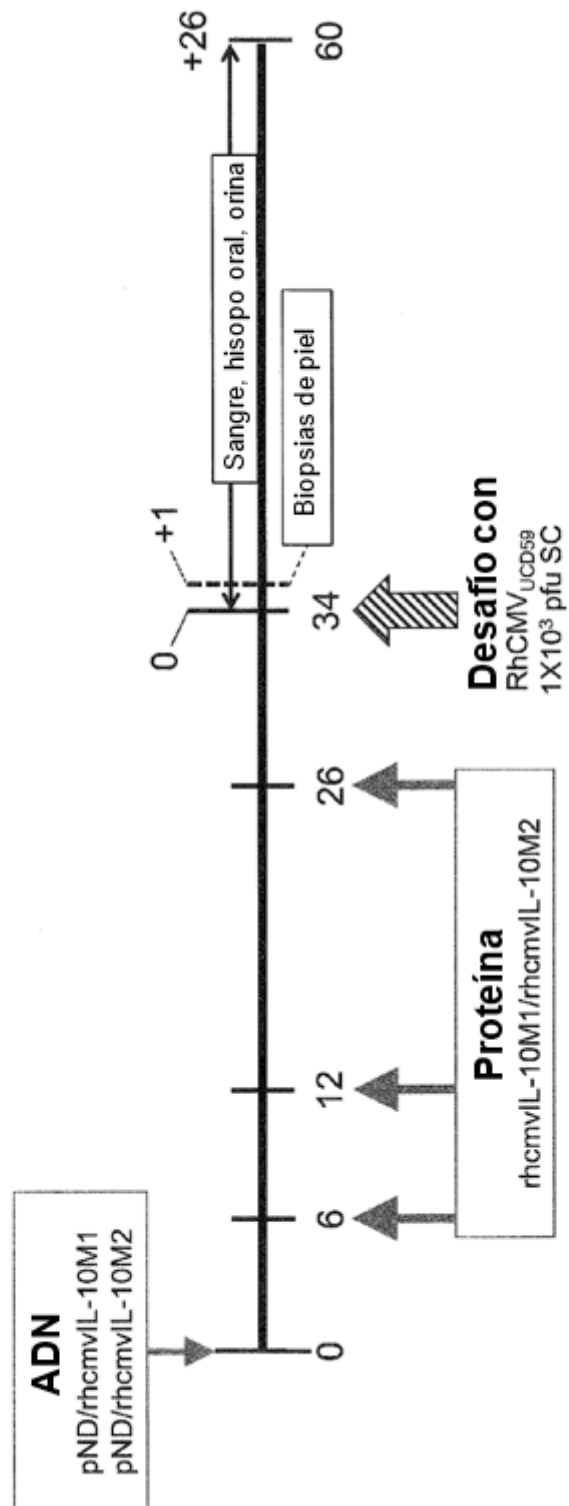
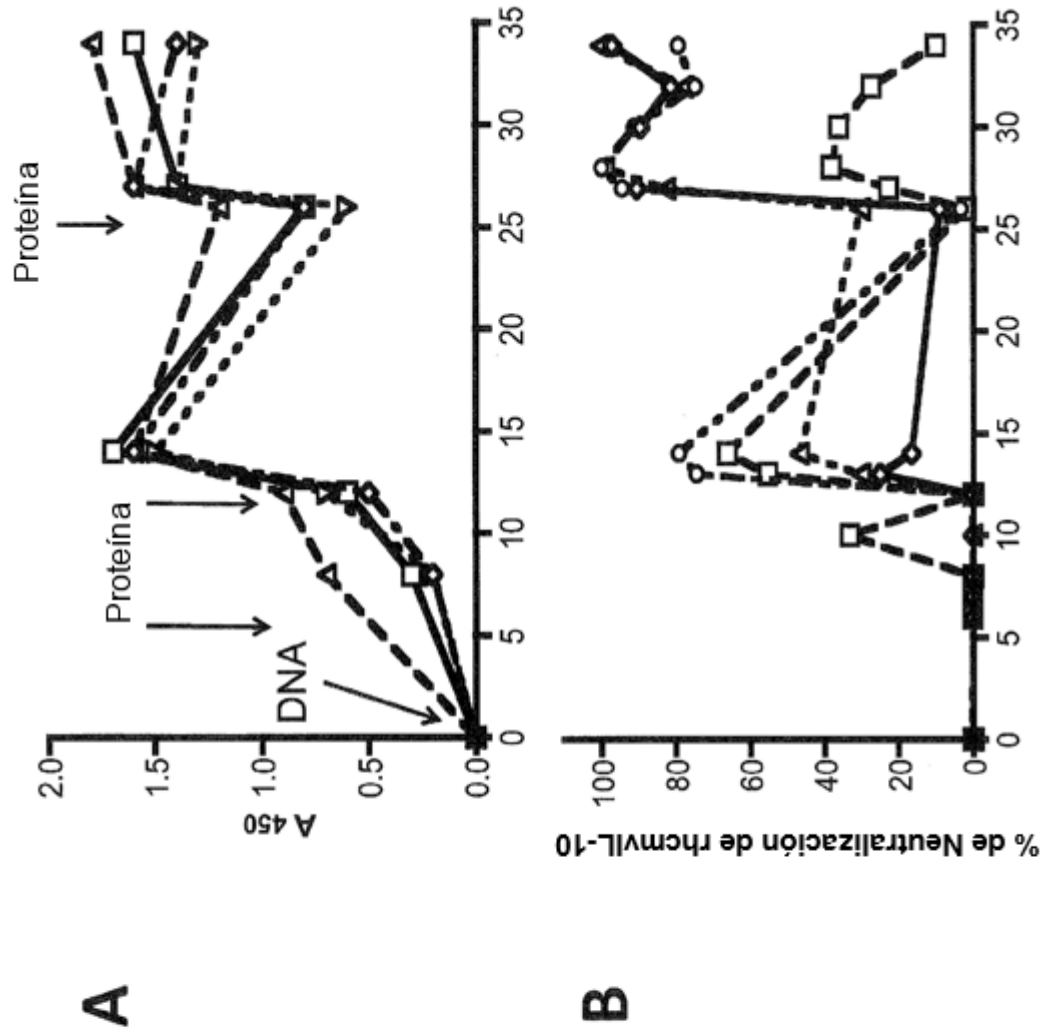


Figura 21

Figura 22



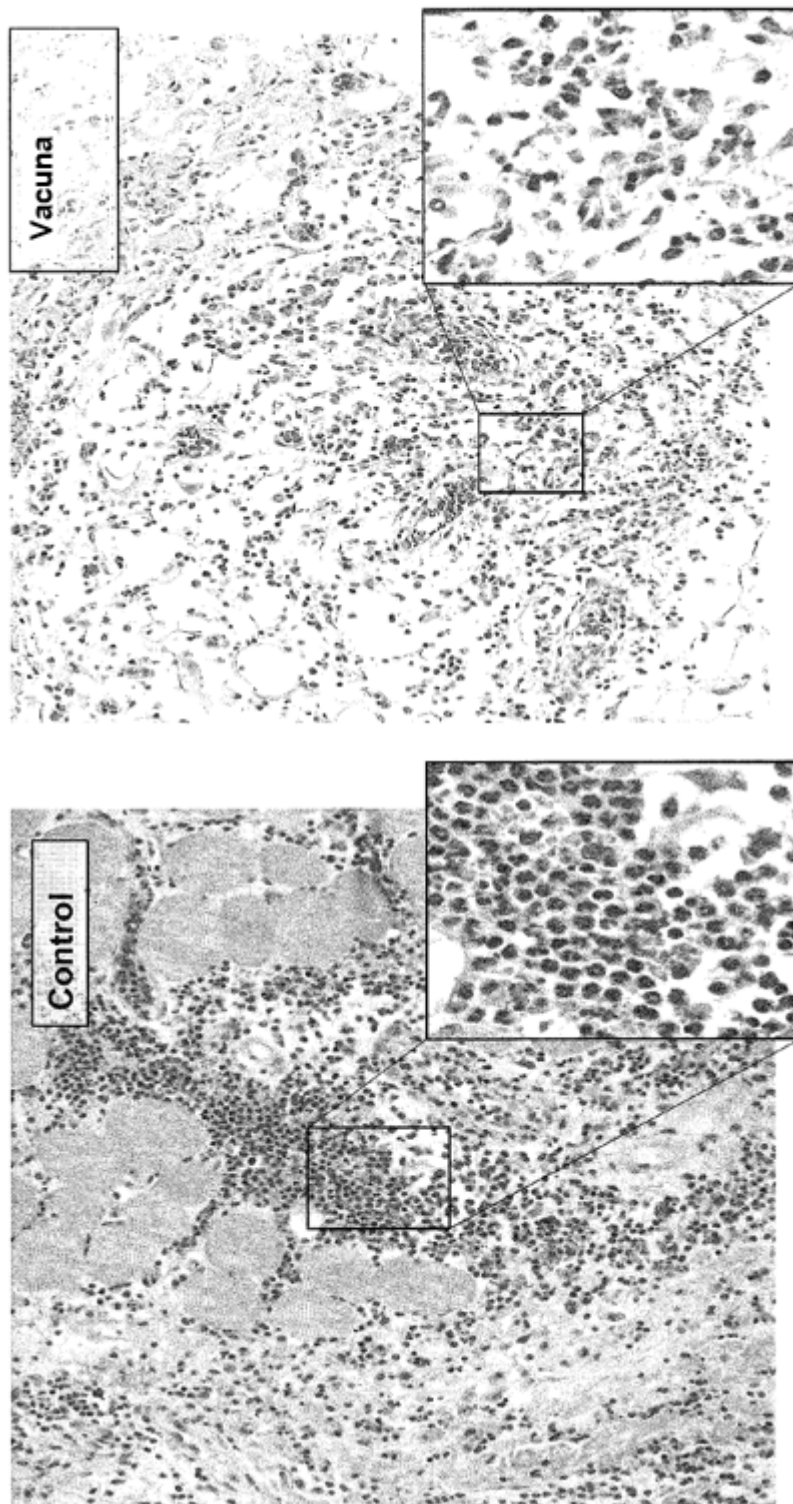


Figura 23

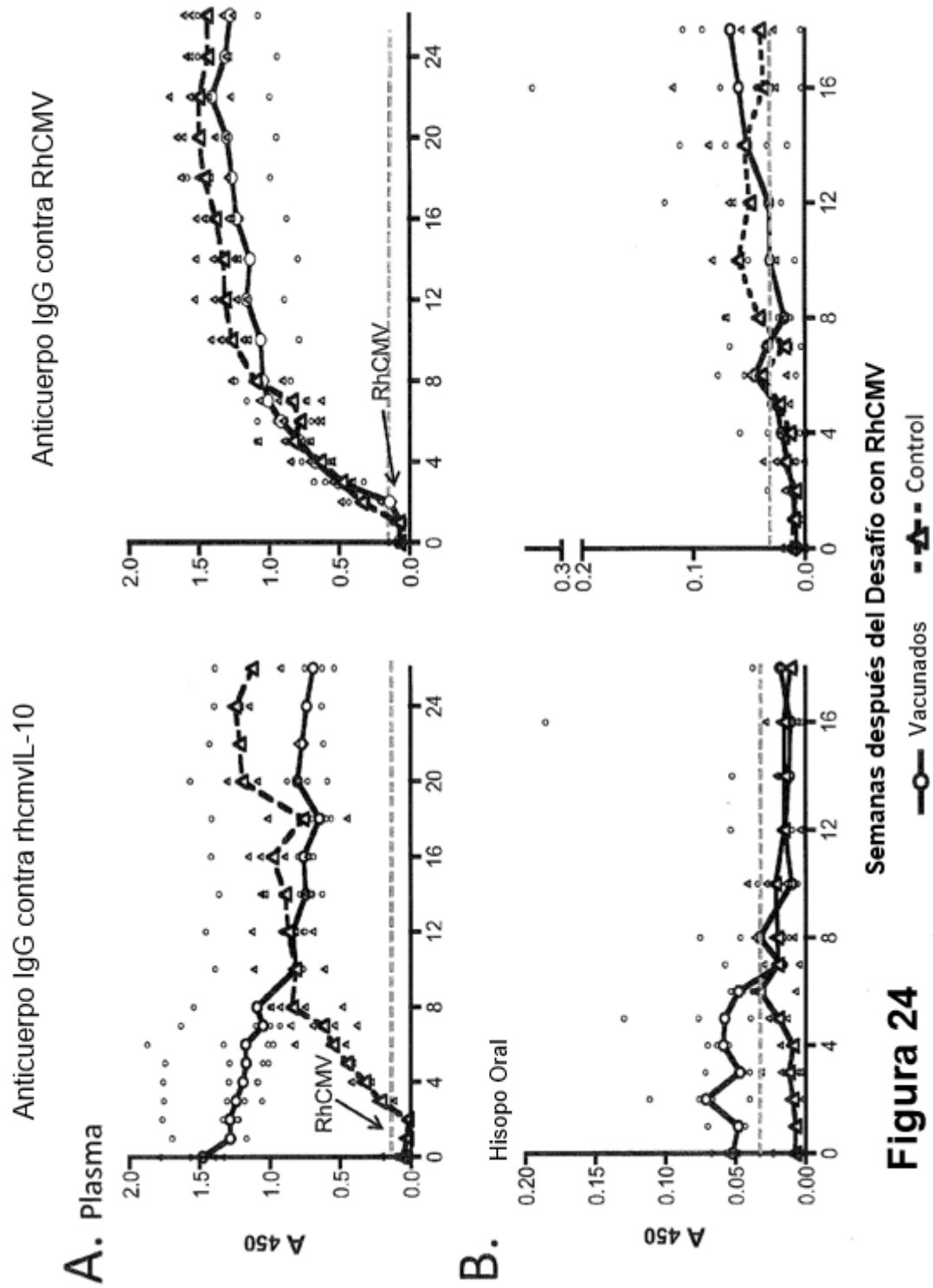


Figura 24

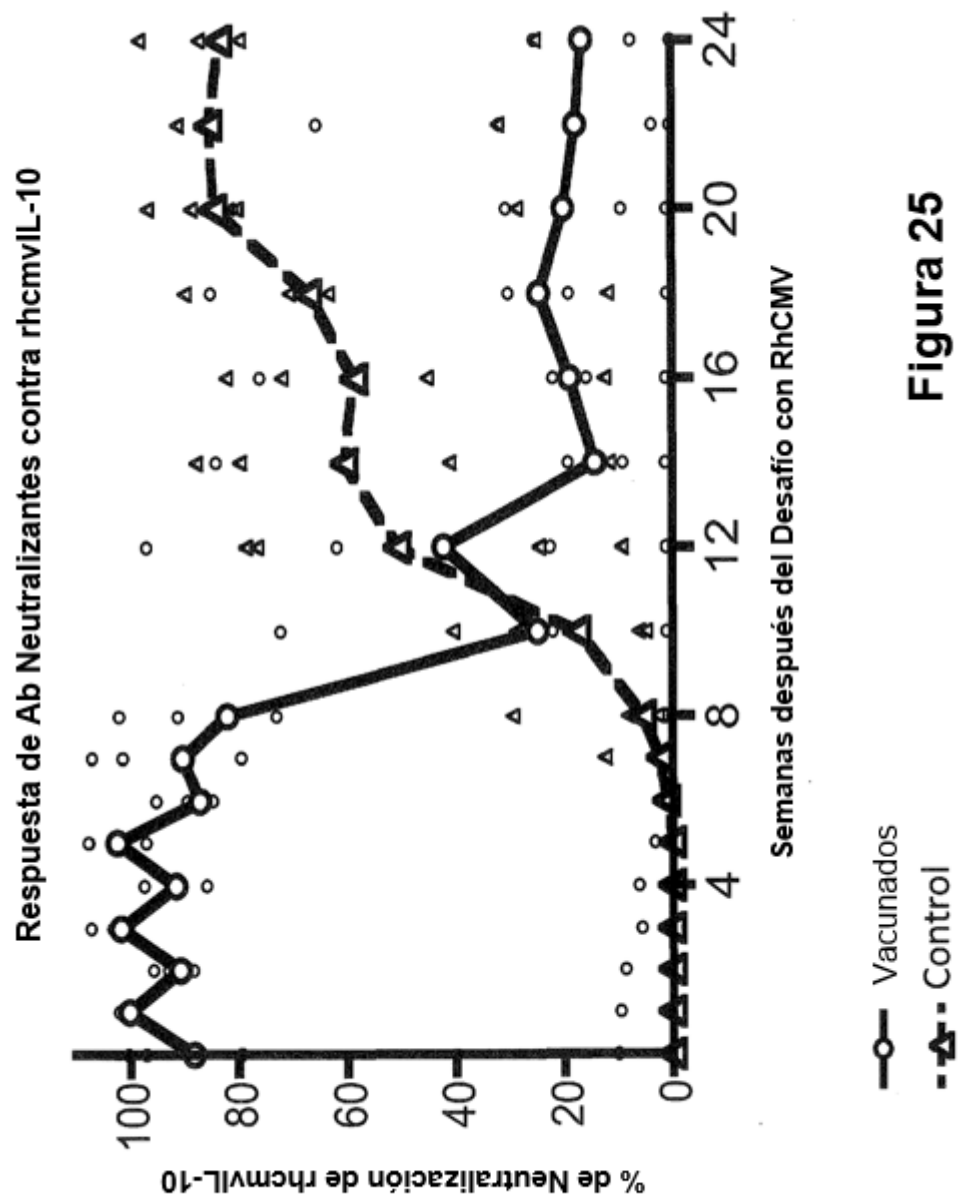


Figura 25

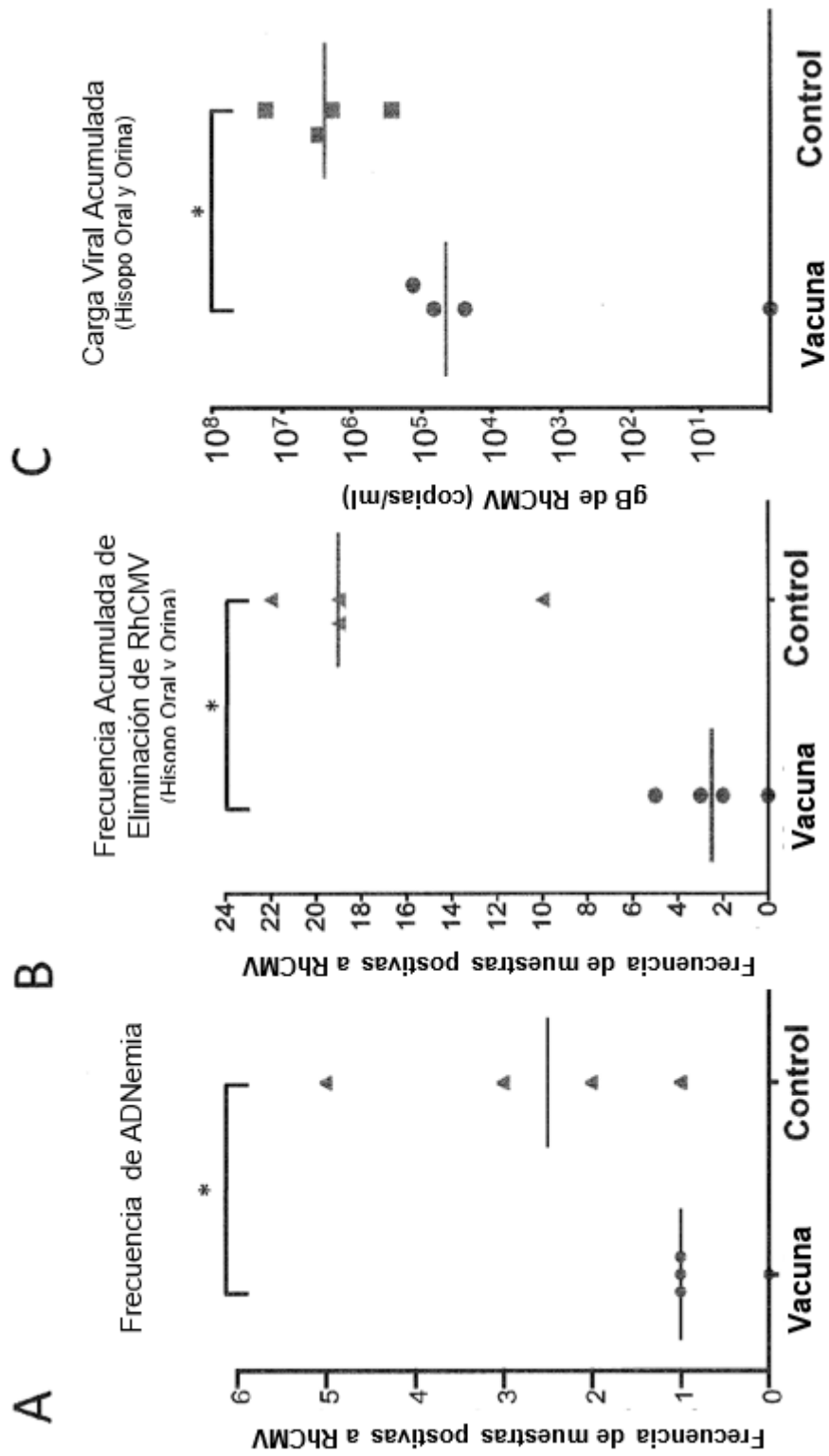


Figura 26

Hisopos Orales

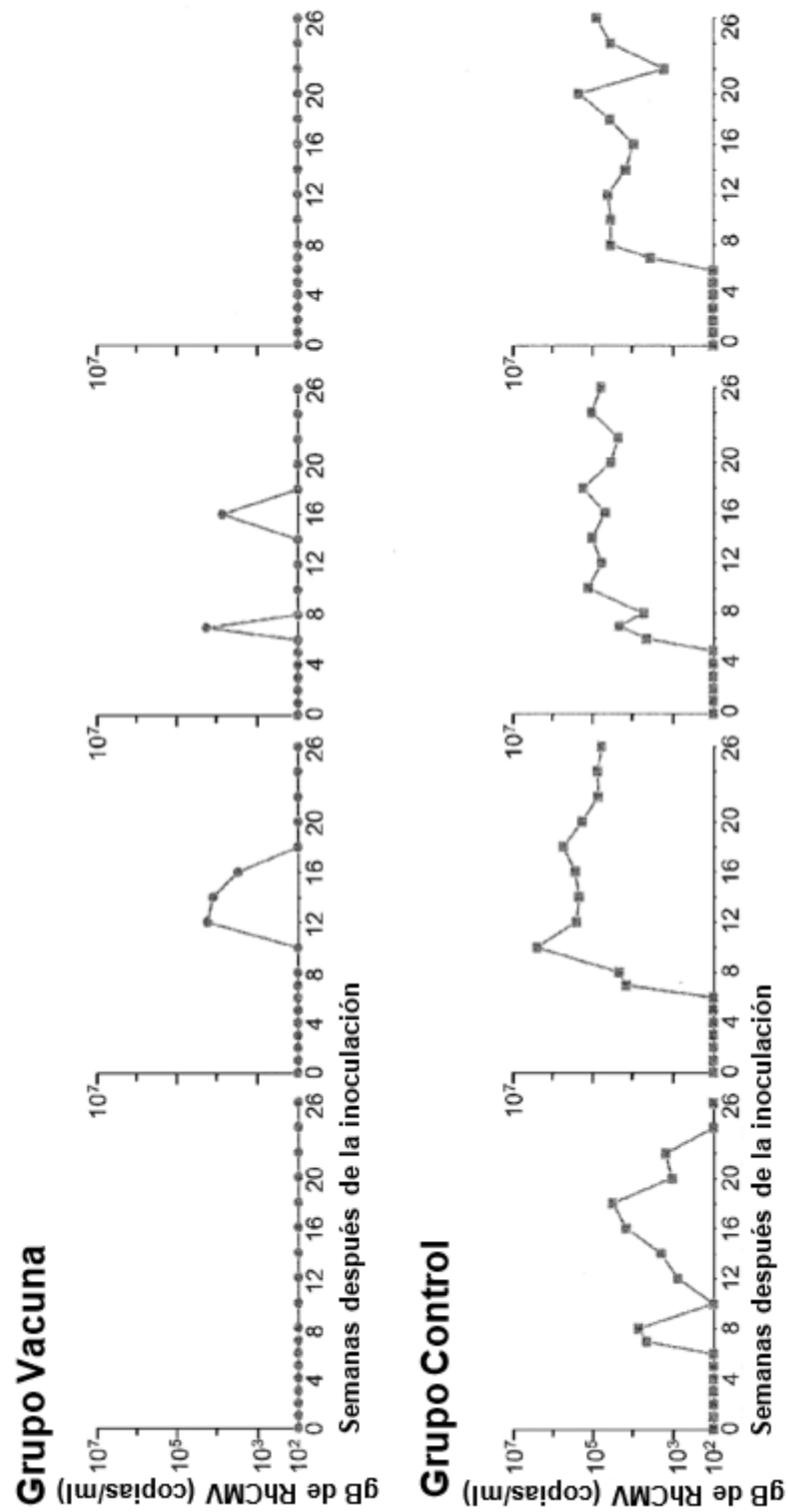


Figura 27

Orina

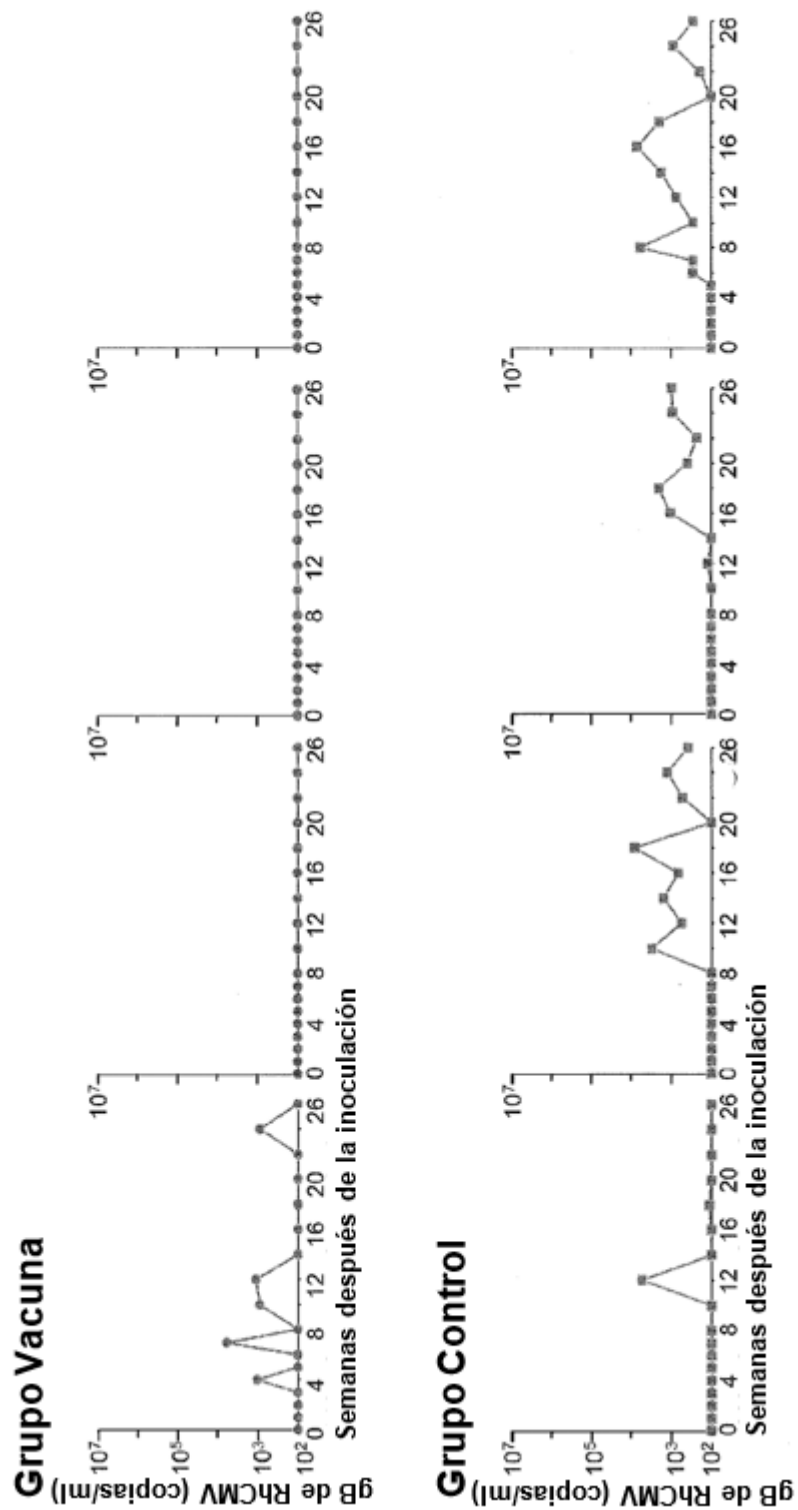


Figura 28

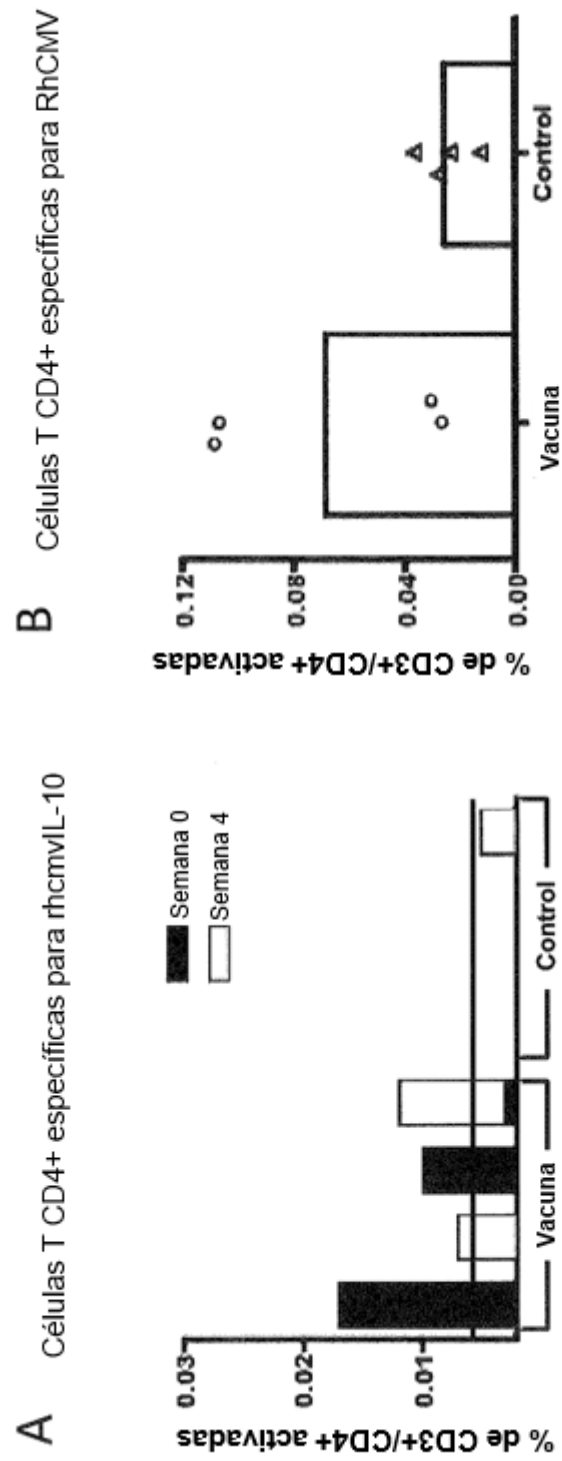


Figura 29