

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 720**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/38** (2006.01)

**A61K 39/245** (2006.01)

**C07K 14/045** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14018117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13822266 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2877580**

54 Título: **Una vacuna de MVA para la administración de un complejo de UL128 y para prevenir la infección por CMV**

30 Prioridad:

**27.07.2012 US 201261676846 P**

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

**12.07.2019**

73 Titular/es:

**CITY OF HOPE (100.0%)  
1500 East Duarte Road  
Duarte, CA 91010, US**

72 Inventor/es:

**DIAMOND, DON, J.;  
WUSSOW, FELIX y  
BARRY, PETER, A.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 719 720 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

Una vacuna de MVA para la administración de un complejo de UL128 y para prevenir la infección por CMV

### 5 ANTECEDENTES

Los genomas de citomegalovirus (CMV) son grandes (> 200 kbp), y el CMV humano (HCMV) codifica  $\geq 165$  marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican proteínas que le permiten infectar múltiples tipos de células, establecer la latencia y reactivarse y mantener una persistencia de por vida en huéspedes inmunocompetentes (Murphy et al. 2003; Barry y Chang 2007; Hansen et al. 2003; Jarvis y Nelson 2007; Rivaller et al. 2006; Schleiss et al. 2008; Oxford et al. 2008). Más del 60 % de los ORF no son esenciales para la replicación de HCMV en los fibroblastos (Dunn et al. 2003; Yu et al. 2003), lo que sugiere que la función de la mayoría de los ORF de HCMV solo se observa en células distintas de los fibroblastos y/o *in vivo*. Un conocimiento más amplio de HCMV debe incluir estudios sobre los ORF y sus tipos celulares relevantes distintos a los fibroblastos, el papel que desempeñan estas células en la transmisión de HCMV y el uso de modelos animales apropiados.

Las células epiteliales y endoteliales (conjuntamente, "Epi/EC") son tipos celulares importantes para la infección y transmisión de HCMV. Después de la diseminación hematogena desde el sitio de la infección primaria, HCMV infecta las células Epi/EC de los tejidos que son importantes para la transmisión horizontal, como las glándulas renales, salivares y mamarias (Sinzger et al. 2008). Numerosos estudios han documentado que el virus se puede excretar en la saliva y en la orina mucho tiempo después de la resolución de una infección primaria y en la leche materna durante embarazos y lactancias sucesivas (Schleiss 2006a; Britt 2008; Wang et al. 2008; Mansat et al. 1997; Stagno et al. 1975). Durante la transmisión vertical, HCMV pasa de los vasos sanguíneos uterinos a las células progenitoras del citotrofoblasto, y las Epi/EC de las vellosidades coriónicas de la placenta son las primeras células fetales infectadas por HCMV (Maidji et al. 2006; Maidji et al. 2002). Debido a que Epi/EC juegan un papel importante tanto en la transmisión horizontal como en la vertical, la eficacia protectora de una vacuna contra HCMV probablemente dependerá de su éxito para generar un título alto de anticuerpos neutralizantes (AcN) contra las proteínas antigénicas de HCMV que previenen la infección de este tipo de célula.

El HCMV es una fuente importante de morbilidad y mortalidad en individuos sin un sistema inmunitario funcional, como los receptores de trasplantes, los coinfectados por el VIH o los fetos/neonatos infectados congénitamente. Actualmente no existen vacunas aprobadas para prevenir la infección y/o la enfermedad por HCMV, sin embargo, el Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias publicó un informe en el año 2000 que sitúa el desarrollo de una vacuna contra HCMV en la categoría de mayor prioridad debido a las mejoras que supondría dicha vacuna para la salud humana. Por lo tanto, sería beneficioso desarrollar una vacuna dirigida a los antígenos virales (Ag) que actúan de mediadores de la infección de Epi/EC y fibroblastos.

Revello M Grazia et al., *Reviews in Medical Virology*, mayo de 2010, vol. 20, n.º 3 (páginas 136 a 155) se refiere al tropismo del citomegalovirus humano por las células endoteliales/epiteliales. Yujuan Yue et al., *Medical Microbiology and Immunology*, Springer, Berlin, DE, vol. 197, n.º 2, 15 de enero de 2008, páginas 117 a 123, se refiere a la evaluación de vacunas de citomegalovirus rhesus basadas en un virus vaccinia Ankara modificado recombinante en macacos rhesus.

### 45 SUMARIO

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Los modos de realización y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención.

En el presente documento, en un modo de realización, se proporciona un sistema de expresión para expresar un complejo de UL128 (UL128C que incluye UL128, UL130, UL131A, glicoproteína H, glicoproteína L). El sistema de expresión incluye una construcción de cromosoma artificial bacteriano (BAC), en el que la construcción de BAC comprende un vector viral insertado con un conjunto de secuencias de ADN que codifican un UL128C. El vector viral es un vector vaccinia Ankara modificado (MVA).

En otro modo de realización, se proporciona una composición de vacuna para prevenir la infección por HCMV. La composición de vacuna incluye un vector viral capaz de expresar un UL128C y un vehículo, adyuvante, aditivo o combinación de los mismos farmacéuticamente aceptable. El vector viral es un vector vaccinia Ankara modificado (MVA).

Se describe un procedimiento para evitar la entrada de HCMV en una célula. Dicho procedimiento incluye poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de un vector viral, comprendiendo el vector viral un conjunto de secuencias de ADN que codifican un UL128C. El vector viral es un vector vaccinia Ankara modificado (MVA).

Se describe un procedimiento para tratar una infección por HCMV en un sujeto. Dicho procedimiento incluye administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una vacuna de HCMV al sujeto, en el que la vacuna de HCMV comprende un vector viral capaz de expresar UL128C, y un vehículo, adyuvante, aditivo (por ejemplo, CD40L) o una combinación de los mismos farmacéuticamente aceptable. El vector viral es un vector vaccinia Ankara modificado (MVA).

De acuerdo con algunos de los modos de realización descritos anteriormente, el vector viral es un vaccinia Ankara modificado (MVA) y el UL128C incluye un conjunto de cinco proteínas de HCMV o fragmentos antigénicos de las mismas: UL128, UL130, UL131A, glicoproteína L (gL) y glicoproteína H (gH). En algunos modos de realización, el vector viral se inserta además con una o más secuencias de ADN adicionales que codifican una o más proteínas de HCMV adicionales o fragmentos antigénicos de las mismas, tales como pp65, gB. Estas proteínas adicionales podrían ser las dianas dominantes de la inmunidad celular, como pp65 y IE1 u otros mediadores importantes de la entrada que estimulan AcN, como las glicoproteínas gB, gM, gN o gO.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un par de esquemas que ilustran la inserción de un casete de expresión génica (figura 1A) y los sitios de inserción de los genes de RhCMV (figura 1B) en el MVA-BAC de acuerdo con algunos modos de realización. La figura 1A muestra un esquema para la inserción de un casete de expresión génica de poxvirus en el MVA-BAC por mutagénesis «*en passant*». Primero se genera una construcción de transferencia que comprende: la secuencia de genes con el promotor mH5 de virus vaccinia aguas arriba, señal de terminación de la transcripción (TS) aguas abajo, sitio de restricción génico interno I-SceI y marcador de resistencia a la kanamicina (Kan<sup>R</sup>), ambos flanqueados por una duplicación del gen de 50 pb (cajas punteadas). Después, la construcción se amplifica por PCR y se inserta mediante recombinación mediada por Red en el MVA-BAC utilizando extensiones con cebadores de 50 pb homólogas. Posteriormente, el marcador de selección Kan<sup>R</sup> se elimina limpiamente mediante la introducción mediada por la expresión de I-SceI de una rotura de doble cadena en el sitio I-SceI y una segunda recombinación mediada por Red subsiguiente de la duplicación del gen de 50 pb. La figura 1B muestra los sitios de inserción (Del2, IGR3, G1L/I8R, extremos del vector BAC (B) en Del3) y las orientaciones de los genes de RhCMV UL128, UL130, UL131A, gL y gH o gHΔTM en el MVA-BAC. El orden de inserción se indica mediante los números 1-5.

La figura 2 muestra las transferencias Western (WB) que detectan la coexpresión de subunidades de RhUL128C expresadas a partir de MVA utilizando antisueros policlonales de conejo. La figura 2A muestra el análisis por WB de lisados celulares totales de células BHK infectadas con MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ. La figura 2B muestra el análisis por WB de lisados celulares totales de células CEF infectadas con MVA que expresan diferentes combinaciones de las subunidades RhUL128-UL131A o con MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ. Se usaron células no infectadas o infectadas con MVA como controles negativos. Para el control de la carga, los lisados se analizaron con el anticuerpo monoclonal 19C2 específico para la proteína BR5 de virus vaccinia. Los marcadores de los tamaños de proteínas se expresan en kilodalton (kD).

La figura 3 muestra WB que detectan la expresión de RhUL128, RhUL130, RhUL131A, RhgL y RhgH durante la propagación de MVA-RhUL128C en células BHK (5 pases de virus). Se analizaron los lisados celulares totales de los 5 pases de virus diferentes (P1-P5) con antisueros policlonales de conejo específicos de péptido correspondientes a cada gen de RhCMV. Para el control de la carga, los lisados se analizaron con el anticuerpo monoclonal 19C2 específico para la proteína BR5 de virus vaccinia. Se usaron células BHK infectadas con MVA y no infectadas como controles.

La figura 4 muestra WB que detectan la co-inmunoprecipitación de RhgHΔTM con subunidades de RhUL128C después de la inmunoprecipitación de RhgHΔTM expresada por MVA-RhUL128Δ. Se usaron lisados de células BHK infectadas con MVA-RhUL128CΔ para la inmunoprecipitación con proteína A/G-agarosa y anticuerpo monoclonal de ratón anti-marcador c-myc o anticuerpo de control IgG irrelevante. Las muestras inmunoprecipitadas se analizaron después por WB con antisueros policlonales de conejo específicos para cada subunidad individual. Las células BHK infectadas con MVA se analizaron como control.

La figura 5 ilustra la secreción de RhgHΔTM tras la expresión de las subunidades de RhUL128C expresadas por MVA. WB para RhgHΔTM y RhgH celulares o secretadas después de la expresión de una sola, coexpresión con RhgL, o RhgL y RhUL128-UL131A. Las células CEF se infectaron a una MOI de 0,1 y se cultivaron durante 36-48 horas en medio sin suero (VP-SFM), y los lisados celulares y el medio concentrado se analizaron con antisueros policlonales. Se analizó MVA no recombinante como control. La proteína BR5 de virus vaccinia se analizó como control de la carga. Las intensidades de banda relativas se expresan mediante números debajo de cada carril.

La figura 6 muestra las mediciones *in vitro* de AcN en MR vacunados antes del desafío con RhCMV. A y B) muestran los títulos NT50 medidos en células epiteliales de riñón de mono (MKE) dos (A) y seis (B) semanas después de la vacunación (Vx) para los grupos de vacunas indicados. C y D) muestran los títulos NT50 medidos dos (C) y seis (D) semanas después de la Vx en fibroblastos (Telo-RF). Los valores dados para los MR vacunados con MVA-RhgB o MVA-venus medidos en Telo-RF ya se han publicado anteriormente (1) (asteriscos). Las

medianas se representan mediante barras. El rango normativo de NT50 medido en MKE o Telo-RF para monos infectados de forma natural se indica mediante líneas discontinuas. Las flechas indican el límite de detección del ensayo. Los valores de p que comparan el grupo de vacuna de MVA-RhUL128C y el grupo de vacuna de MVA-RhUL128CΔ o uno de los otros grupos de vacunas (RhUL128, RhUL130, RhUL128/UL130/UL131, RhgB, venus) se calcularon mediante una prueba de suma de rangos unilateral. Los valores de p en C que comparan el grupo de vacuna de MVA-RhUL128C o de MVA-RhUL128CΔ y el grupo de vacuna de MVA-RhgB se calcularon mediante la prueba de suma de rangos bilateral.

La figura 7 muestra la carga vírica del virus de desafío RhCMV en plasma de MR vacunados. Se muestra el área bajo la curva del número de copias del genoma detectables en plasma de MR vacunados con MVA-RhUL128CΔ, MVA-RhUL128C y animales de control no vacunados 16 semanas después del desafío. La mediana del AUC de cada grupo se indica mediante una línea continua. Los valores de p entre los grupos de las vacunas y el grupo de control no vacunado se calcularon mediante una prueba de suma de rangos unilateral.

La figura 8 muestra la expresión de subunidades de UL128C (H-UL128C) humanas de MVA. Se muestran los resultados de extractos de células enteras en carriles individuales de MVA que expresan los antígenos de las subunidades de UL128C de HCMV. La detección de las proteínas en membranas de PVDF después de SDS-PAGE se realizó utilizando AcM específicos de HCMV (gH, UL128, UL130) y sueros policlonales (UL131A, gL) obtenidos en conejos a partir de péptidos específicos de H-UL128C. CEF = fibroblastos de embrión de pollo, BR5 = AcM contra una proteína endógena de MVA utilizada como control de la carga.

La figura 9 muestra la co-inmunoprecipitación de subunidades de UL128C de HCMV expresadas por MVA. Se usaron lisados de células BHK infectadas con MVA-UL128C para la inmunoprecipitación de gH con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HCMV-gH 14-4b o anticuerpo de control irrelevante acoplado a proteína A/G-agarosa. Posteriormente, las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante WB con anticuerpos monoclonales de ratón contra HCMV-gH (clon AP86), UL128 o UL130 y con antiseros policlonales de conejo contra gL o UL131 de HCMV (como se muestra).

La figura 10 es un esquema para generar MVA-BAC autoescindible. En primer lugar, un vector BAC que consta de marcador de resistencia al cloranfenicol (CM<sup>R</sup>), replicón mini-F y casete de expresión de GFP dirigido por el promotor P11 de virus vaccinia se inserta en el locus de la timidina quinasa (TK) de MVA por recombinación en CEF. Posteriormente, se rescata un clon genómico recombinante de *E. coli* y se inserta una duplicación genómica inversa por mutagénesis «*en passant*» basada en la recombinación mediada por Red de 2 pasos en el vector BAC. Después de la transfección de BAC en células permisivas con MVA, las secuencias del vector BAC se eliminan mediante recombinación por escisión de la duplicación genómica.

La figura 11 ilustra la expresión de insertos de HCMV por MVA reconstituidos a partir de un 1974-MVA-BAC. En la figura 11A, se muestra la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP) por microscopía de fluorescencia de placas virales únicas de células BHK-21 infectadas con MVA que contienen casetes de expresión de mRFP en los sitios de inserción Del2, IGR3 o G1L. MVA también expresa GFP debido a la construcción del vector BAC (lado derecho de la figura). En la figura 11B, el análisis por transferencia Western de CEF infectados con MVA que expresan UL128 humana expresada a partir de Del2, UL131A humana expresada a partir de IGR3, o gH humana de longitud completa expresada a partir de G1L. Se analizaron CEF infectados con MVA no recombinante como control no específico. Las proteínas se detectaron con anticuerpo policlonal de conejo (UL131A) o anticuerpo monoclonal de ratón (UL128, gH).

La figura 12 muestra los títulos de AcN en ratones Balb/C vacunados. A y B) muestran el título de AcN (NT50) de ratones Balb/C en diferentes momentos después de la inmunización con las vacunas de MVA indicadas. Los ratones Balb/C se inmunizaron dos veces, con un intervalo de 4 semanas y los títulos de AcN en suero se midieron tres semanas después de cada inmunización en las semanas 3 y 7 y adicionalmente en la semana 20 después de la primera inmunización. Los títulos de AcN se determinaron en células epiteliales ARPE-19 humanas (A) y fibroblastos de prepucio humano (HFF-1) (B) utilizando la cepa VHL-1 de HCMV para la infección. C) muestra la actividad de neutralización 20 semanas después de la primera inmunización contra las cepas VHL-1, TB40/E y TR de HCMV en células ARPE-19. Las flechas adyacentes al eje y en A, B y C indican el límite de detección del ensayo. La línea de puntos superior de A y C indica la actividad de neutralización en sueros combinados de individuos positivos para HCMV contra la cepa VHL-1 de HCMV medida en células ARPE-19. La línea de puntos superior de B muestra la actividad de neutralización en sueros de donantes positivos para HCMV contra la cepa de laboratorio AD169 determinada en fibroblastos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se proporcionan sistemas de expresión y vacunas para usar en la prevención o el tratamiento de la infección por HCMV. Los sistemas de expresión y las vacunas, que se describen en detalle a continuación, generan anticuerpos neutralizantes (AcN) contra proteínas o fragmentos antigénicos de HCMV para bloquear la entrada del virus a sus células huésped, evitando así la transmisión horizontal y vertical del virus.

A pesar de varias décadas de esfuerzo, el desarrollo de la vacuna contra HCMV sigue siendo una prioridad de salud pública no resuelta (Arvin et al. 2004; Stratton et al. 2001). Se ha logrado cierto progreso con una subunidad de vacuna basada en glicoproteína B (gB) (Zhang et al. 2006; Zhang y Pass 2004). Las mujeres embarazadas que desarrollan AcN anti-gB de alta avidéz durante la infección primaria tienen menos probabilidades de tener un hijo con infección congénita que las mujeres que no generan anticuerpos anti-gB de alta avidéz (Boppana y Britt 1995). Si bien los resultados resaltan la importancia de los AcN anti-gB para limitar la infección congénita, existen factores indefinidos asociados a la transmisión transplacentaria. Algunas mujeres que desarrollaron anticuerpos anti-gB de alta avidéz tuvieron fetos con infección congénita, mientras que no se produjo transmisión congénita en mujeres con anticuerpos de baja avidéz (Boppana y Britt 1995).

Se ha demostrado que la inmunoterapia pasiva protege al feto de las consecuencias devastadoras de la infección intrauterina. Esto sugiere que una globulina hiperinmune puede disminuir la frecuencia de la infección congénita, reducir el engrosamiento de la placenta y resolver los signos de la enfermedad en el sistema nervioso central (Adler y Nigro 2006; Adler et al. 2007; La Torre et al. 2006; Nigro et al. 2005 ; Nigro et al. 2008). Los hallazgos recientes han demostrado que la mayoría de las globulinas AcN hiperinmunes contra CMV están dirigidas contra UL128C (Fouts et al. 2012).

La vacuna atenuada contra HCMV Towne («Towne»), obtenida después de pases repetidos en fibroblastos humanos (Plotkin et al. 1975), genera AcN para prevenir la entrada en los fibroblastos de HCMV y respuestas inmunes celulares contra antígenos virales (Gonczol y Plotkin 2001). La inmunización con Towne protege contra HCMV a dosis bajas (Plotkin et al. 1989) y protege parcialmente a los receptores de trasplante renal negativos para HCMV de la enfermedad grave por HCMV tras el trasplante (Plotkin et al. 1991). Aunque Towne estimuló respuestas linfoproliferativas comparables a la exposición a virus de tipo salvaje, los títulos de AcN fueron de 10 a 20 veces más bajos que los observados después de una infección natural medida en fibroblastos. La cepa Towne sufrió cambios genómicos durante la propagación en fibroblastos humanos, incluida la mutación de la proteína UL130 que desestabiliza la expresión en la superficie celular de UL128C (Patrone et al. 2005) (ver más abajo). De manera similar a las limitaciones potenciales de la vacuna contra gB (Sinzger et al. 2008; Cui et al. 2008), la ausencia de AcN contra antígenos de CMV específicos de Epi/EC puede limitar la eficacia protectora de Towne. Por lo tanto, es probable que Towne esté demasiado atenuada para estimular una inmunidad robusta, atribuible a la mínima replicación *in vivo* y la falta de persistencia o evidencia de latencia. En consecuencia, se utilizaron cepas quiméricas de vacunas entre Towne y un aislado natural (Toledo) en estudios de fase I para aumentar la replicación manteniendo la virulencia (Heineman et al. 2006).

Las vacunas basadas en HCMV también pueden estar limitadas por la evasión inmune que deriva en sobreinfección de las mujeres positivas para HCMV por una cepa de HCMV no relacionada que produce infección congénita (Boppana et al. 2001). Se ha probado una estrategia de vacuna con ADN que comprende los antígenos pp65 y gB en el ámbito de los trasplantes, pero los niveles de anticuerpos específicos anti-gB se estimularon mínimamente y los niveles no se consideraron lo suficientemente altos como para proteger contra una infección progresiva (Wilck et al. 2010; Wloch et al 2008; Kharfani-Dabajia et al. 2012).

Un ensayo de fase II que evaluaba gB recombinante mezclado en el adyuvante MF59 (gB/MF59) demostró una eficacia del 50 % para prevenir la infección primaria por HCMV en mujeres seronegativas que habían dado a luz en el año anterior (Pass et al. 1999; Pass et al. 2009). Por el contrario, en un ensayo anterior, una cepa Towne de HCMV viva atenuada ("Towne") no protegió a las madres seronegativas con al menos un niño que excretaba HCMV contra la infección primaria por HCMV (Adler et al. 1995). Estos resultados hacen pensar que las vacunas dirigidas a neutralizar epítomos pueden reducir significativamente la tasa de infección primaria en mujeres negativas para HCMV. Sin embargo, la ausencia de protección completa en ambos ensayos sugiere que es necesario actuar sobre otros epítomos neutralizantes no codificados por gB para eliminar el riesgo de infección primaria de la madre y la infección congénita del feto. En particular, deberían incluirse epítomos que induzcan a los AcN a bloquear la infección por HCMV de los linajes de células Epi/EC en las vacunas de CMV como se describe a continuación.

Después de una infección primaria de una célula o una población de células de una superficie mucosa, HCMV se propaga a través de la sangre a distintos órganos del cuerpo. El HCMV tiene un tropismo infeccioso por muchas células, como Epi/EC, fibroblastos, macrófagos (Sinzger et al. 2007; Plachter et al. 1996), y citotrofoblastos (Maidji et al. 2006; Maidji et al. 2002). La entrada de los virus en los distintos tipos de células requiere diferentes complejos de glicoproteínas de la envoltura gH y gL (gH/gL) (Sinzger y Jahn 2008; Vanarsdall y Johnson 2012). Sin embargo, debido a su facilidad de uso, el cultivo de HCMV y la cuantificación de los títulos de AcN se han investigado típicamente utilizando fibroblastos.

Los estudios basados en la neutralización de la infección por fibroblastos usando cepas de HCMV adaptadas al cultivo tisular (por ejemplo, AD169 o Towne) han identificado glicoproteína B (gB), glicoproteína H (gH) y los complejos de glicoproteína M (gM) y glicoproteína N (gN) (gM/gN) como dianas principales de los AcN (Adler et al. 1998; Britt et al. 1990; Marshall et al. 1994; Rasmussen et al. 1991; Shimamura et al. 2006). gB genera la mayoría de los anticuerpos encontrados en individuos inmunes que neutralizan la infección de los fibroblastos al bloquear la fusión mediada por gB entre el virión y la membrana celular (Kinzler y Compton 2005; Navarro et al. 1993; Britt 1984; Britt et al. 1988; Gonczol et al. al. 1990; Liu et al. 1991). Sin embargo, al igual que los estudios de

vacunación descritos anteriormente, los estudios de neutralización basados en fibroblastos definen de forma incompleta las respuestas de AcN a la infección por HCMV. Es probable que esto se deba a la ineficacia en la prevención de la infección de Epi/EC, ya que los estudios de neutralización no han detectado AcN que bloqueen la infección de Epi/EC.

5

Los genomas de CMV humano (HCMV) y CMV de macaco (RhCMV) son en gran parte colineales (Hansen et al. 2003; Rivailler et al. 2006), y al igual que HCMV, se ha demostrado que la región de virulencia UL/b' de RhCMV sufre reordenamientos tras el pase de cultivo que provoca la eliminación de múltiples marcos de lectura abiertos (ORF) (Oxford et al. 2008). Mientras que la entrada de HCMV en los fibroblastos depende de gB, gM/gN y de los complejos formados a partir de glicoproteína H, glicoproteína L y glicoproteína O (gH/gL/gO), la entrada en Epi/EC requiere tres ORF que se encuentran en la región UL/b', UL128, UL130 y UL131A. UL128, UL130 y UL131A forman un complejo proteico pentamérico de virión con gH/gL, llamado UL128C, que participa en la entrada en Epi/EC por endocitosis dependiente de pH bajo, que es diferente de la fusión vírica con los fibroblastos descrita anteriormente (Hahn et al. 2004; Isaacson y Compton 2009; Ryckman et al. 2010; Ryckman et al. 2008a, b; Vanarsdall et al. 2008; Wang y Shenk 2005b; Wille et al. 2010).

10

15

Las cepas de CMV AD169 y Towne han perdido la capacidad de infectar Epi/EC debido a mutaciones en el locus UL128-UL131A (Murphy et al. 2003; Wang y Shenk 2005a). En consecuencia, su tropismo celular restringido hace que estos virus no sean adecuados para cuantificar AcN que inhiben la infección de Epi/EC. El uso de cepas clínicas de HCMV con tropismo celular intacto ha demostrado que los individuos infectados con HCMV producen AcN contra UL128C que bloquean potentemente la infección de Epi/EC (Genini et al. 2011; Macagno et al. 2010). Además, los estudios de AD169 con UL128, UL130 y UL131A reparados han demostrado que gB/MF59 y Towne no inducen un título de AcN específico de Epi/EC comparable a los observados durante la infección natural (Cui et al. 2008). Estos resultados proporcionan evidencia sólida de que UL128C es un determinante importante de la actividad de AcN específicos de Epi/EC (Cui et al. 2008; Gerna et al. 2008). Por lo tanto, un enfoque para minimizar la diseminación del virus de desafío más allá de las superficies mucosas es actuar sobre estas proteínas mediante la vacunación para prevenir la propagación de la infección primaria (ver Wussow et al, 2013, muestran el bloqueo de la infección de Epi/EC y fibroblastos con AcN mediante la vacunación con UL128C).

20

25

30

La traslación clínica de una vacuna contra CMV se ve facilitada por estudios en macacos rhesus (MR), que se considera el modelo más directamente relevante para los seres humanos. Anteriormente, se demostró que la inmunización de MR negativos para RhCMV con MVA que expresan RhgB induce AcN específicos de fibroblastos y reduce el virus de desafío RhCMV en plasma (Abel et al. 2011; Yue et al. 2008; Yue et al. 2003). Además, una vacuna contra MVA trivalente compuesta por RhgB y las dos dianas dominantes de la inmunidad celular, fosfoproteína 65 (Rhpp65) e inmediata temprana 1 (RhlE1), redujo la excreción en el 50 % de los animales vacunados (Abel et al. 2011). Sobre la base de los estudios de que el pentámero UL128C de HCMV es necesario para la entrada en Epi/EC y es un objetivo importante de AcN, los estudios descritos en los siguientes ejemplos demuestran que la vacunación de MR con MVA que expresan UL128C de RhCMV (RhUL128C) inhibe la infección por RhCMV de Epi/EC de macaco y de fibroblastos de macaco. Este enfoque está respaldado por un estudio que demostró que la restauración de UL128, UL130 y UL131A en variantes de RhCMV que carecen de estos ORF restaura el tropismo epitelial (Lilja y Shenk 2008). Además, la inmunización de MR o conejos utilizando AD169 con el gen UL130 reparado y la formación restaurada del pentámero UL128C conduce a un aumento significativo de la actividad de neutralización que inhibe la infección por HCMV de las células epiteliales ARPE-19 en comparación con la inmunización con AD169 parental (Fu et al., 2012). Los estudios descritos a continuación en MR negativos para RhCMV utilizando UL128C de RhCMV como vacuna profiláctica para producir AcN fundamentó la construcción de un equivalente de HCMV que podía prevenir múltiples vías de entrada de la infección por CMV. También pueden construirse vacunas con análogos de UL128C de HCMV o basadas en gB y evaluarse para obtener AcN que prevengan la infección *in vitro* por aislados clínicos virulentos de HCMV. Una vacuna de este tipo puede ser incluso más efectiva para neutralizar la infección por HCMV en las vías de infección de endocitos y fibroblastos.

35

40

45

50

Las formas ensambladas del pentámero UL128C de HCMV junto con subespecies que representan componentes individuales se expresaron en MVA como se describe en el presente documento, y al menos en los párrafos [0005], [0010], [0017], y [0018]. Estas combinaciones de antígenos incluyen gH y gL; UL128, UL130 y UL131; UL128C con gH de longitud completa; y UL128CΔ con el dominio transmembrana de gH eliminado. Además, se insertaron gB y venus en MVA por separado y se evaluaron de manera similar a las subunidades de UL128C en ratones Balb/C. Resumiendo, estos experimentos consistieron en dos rondas de inmunización espaciadas 4 semanas y extracciones de sangre obtenidas a nivel basal y a las 3, 7 y 20 semanas. Sorprendentemente, en ratones inmunizados con UL128C, los títulos de AcN NT50 medidos en células epiteliales ARPE-19 contra la cepa VHL-1 de HCMV se dispararon a 4096 después de una inmunización, y aumentaron ~3 veces después de la segunda inmunización, manteniendo la actividad solo ligeramente por debajo del nivel más alto en el análisis a las 20 semanas (fig. 12A). Se encontró una cantidad paralela, pero mucho menor después de la segunda inmunización cuando se usó la cepa UL128CΔ, mientras que solo se encontró un nivel muy transitorio y relativamente bajo de AcN usando gH/gL-MVA y solo un reconocimiento de fondo cuando se usó gb-MVA o venus-MVA (fig. 12A). La vía de infección fue intraperitoneal, lo que puede haber influido en el nivel de AcN, ya que se ha descrito que la inyección subcutánea o intramuscular de MVA puede aumentar el título de AcN. No obstante, existe una clara

55

60

65

diferencia entre todas las otras construcciones y UL128C que posee gH de longitud completa en términos de inducción de la actividad de neutralización en ratones Balb/C.

Sorprendentemente, el título de AcN medido en fibroblastos HFF-1 en sueros obtenidos de ratones vacunados con MVA-UL128C también fue significativamente mayor que el determinado para todos los demás grupos (fig. 12B). Estos resultados fueron inesperados ya que UL128C nunca ha sido descrito previamente en la bibliografía como un objetivo de AcN que previene la infección de fibroblastos por HCMV. Si bien no se detectó actividad de neutralización en el grupo de la vacuna de MVA-UL128C después de la primera inmunización, el título de AcN aumentó a 387 después de la segunda inmunización e incluso aumentó ligeramente en la semana 20. El bajo título de AcN también se determinó en ratones inmunizados con MVA-UL128CΔ o MVA que expresan gH/gL después de la segunda inmunización, aunque en la semana 20 el título de AcN cayó por debajo del límite de detección del ensayo para ambas vacunas. Además, la actividad de neutralización inducida en ratones vacunados con MVA que coexpresaban UL128-UL131, MVA-gB680 o venus permaneció indetectable durante las 20 semanas. De nuevo, la vía de inmunización puede haber sido subóptima para la inducción de AcN. Sin embargo, estos resultados proporcionan una sólida evidencia de que el pentámero UL128C es superior a gB o cualquier combinación de menos de las 5 subunidades de UL128C para la inducción de la actividad de neutralización que inhibe la infección de Epi/EC y fibroblastos.

Además, la potente actividad de neutralización medida en células ARPE-19 en sueros de Balb/c vacunados con MVA-UL128C de la semana 20 no solo fue efectiva contra el virus VHL-1, sino que también fue efectiva contra las cepas TB40/E y TR de HCMV (fig. 12C). Los títulos determinados para cada uno de los virus eran similares entre sí. El título de AcN en sueros de ratones vacunados con MVA-UL128CΔ determinado para los tres virus diferentes en células ARPE-19 también fueron similares entre sí, pero significativamente menores que el medido en sueros de ratones vacunados con MVA-UL128C. No se confirmó ninguna actividad de neutralización en ratones inmunizados con MVA que expresaban gH/gL, UL128-UL131A, gB o venus. Estos datos proporcionan una sólida evidencia de que la vacunación con el pentámero UL128C induce una actividad de neutralización amplia.

Sobre la base de los estudios descritos anteriormente, se han desarrollado sistemas de expresión, vectores virales y vacunas que se pueden usar en los procedimientos para inhibir la entrada de HCMV en Epi/EC, fibroblastos o ambos, y se describen en el presente documento.

### **Sistemas de expresión de antígenos de CMV y vacunas**

De acuerdo con los modos de realización descritos en el presente documento, se proporciona un sistema de expresión de proteínas antigénicas de HCMV (o «sistema de expresión de antígenos») en el presente documento. En un modo de realización, el sistema de expresión de antígenos puede incluir un vector de clonación para clonar un vector de expresión que sea capaz de expresar una o más proteínas antigénicas de HCMV o fragmentos antigénicos de las mismas.

En un modo de realización, el vector de clonación es un BAC, que es una construcción de ADN que se puede usar para clonar uno o más genes diana de HCMV mediante transformación de bacterias (por ejemplo, *E. coli*). El uso de BAC como vector de clonación permite la clonación estable de secuencias de ADN muy grandes, y se puede manipular fácilmente utilizando técnicas genéticas establecidas para *E. coli*. En algunos modos de realización, se usa el vector de clonación BAC para clonar un vector de expresión. El vector de expresión puede ser un plásmido, un BAC, un vector viral (por ejemplo, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, vectores virales de ARN, vectores lentivirales o vectores retrovirales), un vector viral construido como un BAC, o cualquier otro vector adecuado que sea capaz de expresar una proteína recombinante, un vector viral o ambos.

En algunos modos de realización, el vector de expresión (por ejemplo, el vector viral) es capaz de expresar una o más proteínas de HCMV inmunogénicas o antigénicas o fragmentos funcionales de las mismas. Una proteína inmunogénica es una proteína que, cuando se introduce en un sujeto, es reconocida por las células inmunitarias del sujeto, estimulando así una reacción inmunitaria. La reacción inmunitaria puede dar como resultado la producción de anticuerpos (por ejemplo, la producción de anticuerpos neutralizantes) contra esa proteína. Un fragmento funcional o antigénico de una proteína inmunogénica es cualquier porción de la proteína que contiene una porción antigénica de la proteína o es una porción antigénica de la proteína que puede contener al menos un epítipo. En algunos modos de realización, una o más proteínas inmunogénicas o fragmentos funcionales de las mismas pueden ser un complejo de proteínas inmunogénicas, que incluye un conjunto de subunidades de proteínas inmunogénicas o fragmentos funcionales de las mismas.

En un modo de realización, se usa el vector de clonación BAC para clonar un vector de expresión viral. En dichos modos de realización, el genoma del vector de expresión viral se inserta en una construcción BAC para generar una construcción o plásmido virus-BAC. Un huésped bacteriano (por ejemplo, *E. coli*) se transfecta luego con el plásmido BAC del virus para clonar el vector viral. La transfección de los clones de virus-BAC en células eucarióticas sensibles a la infección por el vector viral da como resultado la reconstitución del virus recombinante. Los vectores virales reconstituidos resultantes se pueden usar después para infectar tejidos o células diana en un huésped.

En algunos modos de realización, el vector viral puede derivarse de cualquier poxvirus adecuado que incluye, pero no se limita a, avipoxvirus (por ejemplo, el virus de la viruela del canario y cepas relacionadas, como ALVAC; virus de la viruela aviar), orthopoxvirus (por ejemplo, cepas de virus vaccinia como la cepa Western Reserve o Lister, cepa Copenhagen (NYVAC), cepa Dryvax, cepa vaccinia Ankara modificada (MVA), ACAM1000 y cepa ACAM2000), parapoxvirus (por ejemplo, virus Orf). En un modo de realización, el vector viral es un vaccinia Ankara modificado (MVA), que se clona en el vector de clonación BAC ("MVA-BAC") y puede expresar una o más proteínas de HCMV inmunogénicas o fragmentos antigénicos de las mismas. Cualquier cepa de MVA adecuada puede clonarse mediante un BAC de acuerdo con los modos de realización descritos en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a, la cepa 1974-MVA, cepa VR o cepa ACAM 3000.

En un modo de realización, una o más proteínas inmunogénicas de HCMV o fragmentos antigénicos de las mismas es un conjunto de subunidades de proteínas inmunogénicas o fragmentos funcionales de las mismas que forman parte de un complejo de UL128 (UL128C). El complejo de UL128 es un complejo de proteínas de HCMV que incluye las siguientes cinco subunidades de proteínas inmunogénicas o fragmentos funcionales de las mismas: UL128, UL130, UL131A, gL y gH. Se requiere la coexpresión de las cinco subunidades de UL128C en células individuales para obtener la expresión funcional (Patrone et al. 2005; Macagno et al. 2009). Por lo tanto, se necesita un único vector de administración (por ejemplo, MVA, ver más abajo), ya que no existe un enfoque generalmente aceptable para guiar > 1 vector individual de ADN o viral para ensamblar un complejo de proteínas *in vivo* mediante la coexpresión de los 5 componentes de UL128C.

La expresión del complejo de UL128 que incluye las proteínas UL128, UL130, UL131A, gL y gH o los fragmentos antigénicos de las mismas mediante los sistemas de expresión y los vectores virales descritos en el presente documento estimula la producción de anticuerpos neutralizantes (AcN) por el sistema inmunitario de un huésped que bloquea la infección por HCMV en células sensibles tales como células epiteliales y endoteliales.

En otros modos de realización, el vector de expresión puede incluir proteínas de HCMV adicionales que incluyen, pero no se limitan a, pp65, gB, IE1 gM, gN, gO, y otras proteínas de HCMV antigénicas adecuadas conocidas en la técnica. Estos genes adicionales pueden insertarse en un primer vector de expresión con las subunidades de UL128C, o alternativamente, pueden insertarse en un segundo vector de expresión para administrarse en combinación con el primer vector de expresión.

De acuerdo con los modos de realización descritos en el presente documento, se proporciona un régimen de inmunización. El régimen de inmunización puede incluir la administración de uno o más vectores o vacunas de inmunización primaria, seguida de la administración de uno o más vectores o vacunas de refuerzo. Un vector de inmunización primaria puede ser cualquier vector de expresión adecuado que incluya las subunidades de UL128C de HCMV o de RhCMV descritas en el vector MVA anterior. En un modo de realización, el vector de inmunización primaria puede ser un vector que incluye ADN plasmídico desnudo que incorpora las mismas subunidades de UL128C de HCMV o de RhCMV que el vector MVA descrito en el presente documento. Vectores o las vacunas de inmunización primaria adicionales pueden incluir vectores virales, vectores bacterianos u otros vehículos de administración, ya sean vivos o sintéticos, administrados antes de la inmunización con MVA. La inmunización primaria puede administrarse una vez, o puede administrarse como un régimen de inmunización primaria de dosis múltiples (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más) que puede incluir una serie de inmunizaciones primarias, administradas en un programa que puede variar de 1 a 4 semanas entre inoculaciones. Por ejemplo, las inmunizaciones primarias pueden administrarse una, dos o tres veces en un régimen o programa que puede variar de 1 a 4 semanas entre las inoculaciones.

En otros modos de realización, el vector MVA descrito anteriormente puede ser una inmunización primaria. En tal caso, las inmunizaciones primarias mencionadas anteriormente también se pueden usar como vectores de refuerzo después de una o más inmunizaciones consecutivas (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más) con MVA. Alternativamente, los vectores de inmunización primaria y refuerzo pueden alternarse de tal manera que la inmunización heteróloga incluya un MVA o un vector alternativo como inmunización primaria seguido de MVA o un vector alternativo como refuerzo de 1 a 4 veces por ejemplo. Los expertos en la técnica pueden usar otros esquemas o regímenes de inmunización adecuados que se conocen en la técnica de acuerdo con los modos de realización descritos en el presente documento.

De acuerdo con algunos modos de realización, los vectores alternativos, tales como el ADN plasmídico desnudo descrito anteriormente, pueden ensamblarse de manera que todas las subunidades de UL128C se ensamblen en un solo vector. Alternativamente, las subunidades de UL128C pueden ensamblarse en varias copias distintas de un vector de expresión base, que puede ser un vector plasmídico, viral o bacteriano. Además, las subunidades de UL128C pueden insertarse en ubicaciones separadas o enlazarse a través de conectores conocidos como sitios internos de unión del ribosoma (IRES), derivados de una serie de virus ARN diferentes que son bien conocidos en la técnica para enlazar todas o una parte de las subunidades en un sitio de inserción o múltiples sitios de inserción. Un conector de este tipo se conoce como 2A o un conector similar de un virus relacionado llamado T2A que se puede usar para enlazar la subunidad de UL128C en un ARN mensajero policistrónico que se puede traducir y procesar para dar múltiples proteínas distintas.

Un vector recombinante, tal como el vector viral MVA descrito anteriormente; o cualquier otro vector alternativo adecuado que incluya vectores de inmunización primaria o de refuerzo descritos anteriormente, puede ser parte de una composición de vacuna de HCMV que se puede usar en procedimientos para tratar o prevenir la infección por HCMV. Una composición de vacuna de HCMV como se describe en el presente documento puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector viral recombinante como se describe en el presente documento, y comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un procedimiento estándar. Los ejemplos de vehículos aceptables incluyen soluciones fisiológicamente aceptables, tales como solución salina estéril y solución salina tamponada estéril.

En algunos modos de realización, la vacuna o la composición farmacéutica se pueden usar en combinación con una cantidad farmacéuticamente efectiva de un adyuvante para potenciar los efectos anti-CMV. Cualquier adyuvante inmunológico que pueda estimular el sistema inmunitario y aumentar la respuesta a una vacuna, sin tener ningún efecto antigénico específico en sí, puede usarse como adyuvante. Muchos adyuvantes inmunológicos imitan a las moléculas conservadas evolutivamente conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y son reconocidos por un conjunto de receptores inmunitarios denominados receptores tipo Toll (TLR). Los ejemplos de adyuvantes que se pueden usar de acuerdo con los modos de realización descritos en el presente documento incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, ARN de doble cadena (un ligando de TLR3), LPS, análogos de LPS como monofosforil lípido A (MPL) (un ligando de TLR4) flagelina (un ligando de TLR5), lipoproteínas, lipopéptidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, análogos de imidazoquinolina (ligandos de TLR7 y TLR8), ADN de CpG (un ligando de TLR9), adyuvante de Ribi (monofosforil lípido A/dicorinomicolato de trehalosa), glicolípidos (análogos de  $\alpha$ -GalCer), islas de CpG no metiladas, emulsión en aceite, liposomas, virosomas, saponinas (fracciones activas de saponina como QS21), muramil dipéptido, alumbre, hidróxido de aluminio, escualeno, BCG, citoquinas como GM-CSF e IL-12, quimioquinas como MIP 1- $\alpha$  y RANTES, ligandos de activación de la superficie celular como CD40L, N-acetilmuramina-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) y timosina  $\alpha$ 1. La cantidad de adyuvante usado puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con el grado de síntomas, como el ablandamiento de la piel, el dolor, el eritema, la fiebre, la cefalea y el dolor muscular, que pueden expresarse como parte de la respuesta inmunitaria en humanos o animales después de la administración de este tipo de vacuna.

En modos de realización adicionales, el uso de otros adyuvantes, fármacos o aditivos diversos con la vacuna de la invención, como se indicó anteriormente, puede potenciar el efecto terapéutico conseguido por la administración de la vacuna o composición farmacéutica. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener una cantidad traza de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Dichos aditivos deben ser no tóxicos para un sujeto humano u otro mamífero a la dosis y concentración utilizadas, y los ejemplos de los mismos incluyen tampones tales como ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético y otros ácidos orgánicos, y sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 residuos) (por ejemplo, poliarginina y tripéptido) (por ejemplo, albúmina sérica, gelatina e inmunoglobulina); aminoácidos (por ejemplo, glicina, ácido glutámico, ácido aspártico y arginina); monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos (por ejemplo, celulosa y sus derivados, glucosa, manosa y dextrina), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA); polioles (por ejemplo, manitol y sorbitol); contraiones (por ejemplo, sodio); tensioactivos no iónicos (por ejemplo, polisorbato y poloxámero); antibióticos y PEG.

La vacuna o la composición farmacéutica que contiene un vector viral recombinante descrito en el presente documento puede almacenarse como una solución acuosa o un producto liofilizado en un envase de dosis única o multidosis, como por ejemplo una ampolla sellada o un vial.

### **Prevención de la entrada de HCMV en una célula, tratamiento de HCMV y prevención de la infección por HCMV**

El sistema de expresión de antígenos descrito anteriormente se puede usar en procedimientos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* para prevenir la entrada de HCMV en una célula o en una población de células. En algunos modos de realización, los procedimientos para prevenir la entrada de HCMV en una célula o una población de células incluyen las etapas de poner en contacto la célula o la población de células con una cantidad efectiva de un vector viral capaz de expresar un complejo de UL128 o fragmentos antigénicos del mismo.

En otros modos de realización, se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir una infección por HCMV en un sujeto. Tales procedimientos pueden incluir administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una vacuna de HCMV al sujeto. La vacuna de HCMV puede incluir al menos un principio activo, en el que el al menos un principio activo incluye un vector viral que es capaz de expresar un complejo de UL128 o fragmentos antigénicos del mismo, tales como los descritos en el presente documento.

Los sistemas de expresión y las vacunas descritos en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir cualquier infección por HCMV que infecte células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos o una combinación de los mismos. Los ejemplos de infecciones por HCMV que pueden tratarse o prevenirse utilizando los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir, pero no se limitan a, infección congénita por HCMV, infecciones oportunistas por HCMV en sujetos con sistema inmunitario inmunocomprometido (por ejemplo,

receptores de trasplantes de órganos y médula ósea, pacientes con cáncer y receptores de quimioterapia, pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores y pacientes infectados por VIH) e infecciones por HCMV asintomáticas en sujetos sin otras enfermedades.

5 El término "cantidad efectiva" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un compuesto que produce un efecto deseado. Por ejemplo, una población de células puede ponerse en contacto con una cantidad efectiva de un compuesto para estudiar su efecto *in vitro* (por ejemplo, cultivo celular) o para producir un efecto terapéutico deseado *ex vivo* o *in vitro*. Se puede usar una cantidad efectiva de un compuesto para producir un efecto terapéutico en un sujeto, como prevenir o tratar una afección diana, aliviar los síntomas asociados con la afección o producir un efecto fisiológico deseado. En tal caso, la cantidad efectiva de un compuesto es una "cantidad terapéuticamente efectiva", "concentración terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva". La cantidad efectiva precisa o la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de la composición que dará los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto o población de células dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a las características del compuesto (que incluyen actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (que incluye edad, sexo, tipo de enfermedad y estadio), condición física general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicamento) o células, la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables de la formulación y la vía de administración. Además, una cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de si el compuesto se administra solo o en combinación con otro compuesto, fármaco, tratamiento u otro procedimiento o modalidad terapéuticos. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva a través de la experimentación rutinaria, es decir, controlando la respuesta de una célula o un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis como corresponda. Para orientación adicional, ver Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.

"Tratar" o "tratamiento" de una afección puede referirse a prevenir la afección, retardar la aparición o la velocidad de progresión de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar la aparición de síntomas asociados con la afección, reducir o eliminar los síntomas asociados con la afección, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de los mismos. El tratamiento también puede significar un tratamiento profiláctico o preventivo de una afección.

En algunos modos de realización, la vacuna o composición farmacéutica descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con otros productos farmacéuticos conocidos, tales como péptidos que estimulan la respuesta inmunitaria y agentes antibacterianos (agentes antibacterianos sintéticos). La vacuna o composición farmacéutica pueden comprender además otros fármacos y aditivos. Los ejemplos de fármacos o aditivos que pueden usarse junto con una vacuna o composición farmacéutica descritas en el presente documento incluyen fármacos que ayudan a la captación intracelular del virus recombinante o MVA o proteína transgénica recombinante de la presente invención, liposomas y otros fármacos y/o aditivos que facilitan la transfección (por ejemplo, emulsionantes fluorocarbonados, cocleatos, túbulos, partículas de oro, microesferas biodegradables y polímeros catiónicos).

En algunos modos de realización, la cantidad del principio activo contenido en la vacuna o composición farmacéutica descritas en el presente documento puede seleccionarse de un amplio rango de concentraciones, unidades de partículas virales (VPU), unidades formadoras de placas (UFP), porcentaje peso a volumen (p/v %) u otra medida cuantitativa de la cantidad de principio activo, siempre que sea una cantidad terapéutica o farmacéuticamente efectiva. La dosis de la vacuna o composición farmacéutica se puede seleccionar de manera apropiada de un amplio rango de acuerdo con el efecto terapéutico deseado, el procedimiento de administración (vía de administración), el período terapéutico, la edad, el sexo y otras afecciones del paciente, etc.

En algunos aspectos, cuando se administra un vector viral recombinante a un sujeto humano como principio activo de la vacuna o composición farmacéutica, la dosis del virus recombinante o MVA se puede administrar en una cantidad que corresponde aproximadamente a entre  $10^2$  y  $10^{14}$  UFP, preferentemente entre  $10^5$  y  $10^{12}$  UFP, y más preferentemente entre  $10^6$  y  $10^{10}$  UFP por paciente, calculada como las UFP del virus recombinante.

En aspectos adicionales, cuando se administra un vector viral recombinante a un sujeto como principio activo de la vacuna o composición farmacéutica, la dosis se puede seleccionar de un amplio rango en términos de la cantidad de ADN expresable introducido en el huésped de la vacuna o la cantidad de ARN transcrito. La dosis también depende de la potencia de los promotores de la transcripción y la traducción utilizados en los vectores de transferencia utilizados.

En algunos modos de realización, la composición de la vacuna o la composición farmacéutica descritas en el presente documento pueden administrarse inyectando directamente una suspensión de vector viral recombinante preparada suspendiendo el virus recombinante o MVA en PBS (solución salina tamponada con fosfato) o solución salina en un sitio local (por ejemplo, en el tejido pulmonar, hígado, músculo o cerebro), por inhalación nasal o respiratoria, o por vía intravascular (IV) (por ejemplo, administración intraarterial, intravenosa y venosa portal),

subcutánea (SC), intracutánea (IC), intradérmica (ID) o intraperitoneal (IP). La vacuna o composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar más de una vez. Más específicamente, después de la administración inicial, se pueden administrar una o más vacunas adicionales como refuerzo. Una o más administraciones de refuerzo pueden mejorar el efecto deseado. Después de la administración de la vacuna o la composición farmacéutica, se puede realizar una inmunización de refuerzo con una composición farmacéutica que contiene el virus recombinante o MVA como se describen en el presente documento.

Las evaluaciones de los ensayos de vacunas de HCMV, los estudios *in vitro* y el trabajo en el modelo de RhCMV aquí descrito convergen en la premisa de que debe incluirse el complejo de proteínas de UL128 (UL128C: UL128, UL130, UL131A, gH y gL) en una formulación de vacuna para interferir con una importante entrada de la infección de HCMV: las células endoteliales y epiteliales. La función de este complejo de proteínas se neutraliza mediante la inmunización para bloquear tanto la diseminación desde un sitio de infección a sitios distales como la transmisión de virus infecciosos por un huésped infectado. UL128C solo o junto con otros antígenos candidatos para la vacuna, dicho enfoque proporciona una base racional para inhibir significativamente la transmisión vertical y horizontal de HCMV. Los modelos de HCMV en animales pequeños (es decir ratón, cobaya [gp] y rata) continuarán desempeñando un papel traslacional vital en el modelado de las modalidades de vacunas. De los modelos de roedores, solo el CMV de cobaya (gpCMV) codifica homólogos de las secuencias de UL128 y UL130 (Schleiss et al. 2008; Yamada et al. 2009), mientras que la importancia funcional de las proteínas de UL128C para el tropismo celular está restringida a los CMV de primates (Hansen et al. 2003; Rivaille et al. 2006; Oxford et al. 2008). Los datos descritos en el ejemplo 1 más adelante han demostrado la aplicabilidad y la posibilidad de traslación de los enfoques de la vacuna de HCMV en un huésped de primate altamente relevante.

Los siguientes ejemplos demuestran que a través de la manipulación de un MVA derivado de BAC, cada una de las 5 proteínas de las subunidades que constituyen UL128C se han clonado en serie en sitios de inserción separados de MVA mantenidos como un plásmido BAC (MVA-BAC). La función de UL128C después de la vacunación de macacos rhesus (MR) negativos para RhCMV con UL128C-MVA y que demuestra la producción de un título alto de AcN que inhiben la infección de células Epi/EC y fibroblastos por aislados naturales virulentos de RhCMV. Basándose en estos resultados en MR, es probable que se pueda ensamblar en MVA-BAC un equivalente en HCMV a UL128C de macaco y se use para vacunar a MR para que produzcan AcN que eviten la infección *in vitro* por HCMV de múltiples tipos de células permisivas.

En un modo de realización descrito en el ejemplo 2, puede construirse un complejo de UL128 utilizando tecnología molecular de MVA-BAC. Usando el ADN viral preparado a partir de la cepa 1974-MVA que se usa actualmente en ensayos clínicos, se generará un MVA-BAC autoescindible utilizando los procedimientos descritos en el presente documento. Posteriormente, pueden clonarse cinco subunidades humanas de UL128C (UL131A, UL130, UL128, gL y gH) en serie en MVA-BAC. En algunos modos de realización, se puede analizar que la expresión de las cinco subunidades de un único rMVA sea igual para determinar la estabilidad mediante pases sucesivos en un sustrato de células para vacunas humanas aceptable por la FDA, fibroblastos de embrión de pollo. La inmunización en ratones confirma aún más la capacidad funcional de la vacuna de UL128C-MVA contra HCMV para generar la formación de AcN que inhiben la infección de células Epi/EC humanas sensibles por un aislado natural virulento de HCMV. Usando una vía de inmunización intraperitoneal (IP), se vacunaron ratones Balb/C en grupos de cuatro animales con cepas de MVA que incluían UL128C, UL128CΔ, UL128-UL130-131, gH/gL, gB y Venus. Las células que se utilizaron para la neutralización *in vitro* fueron ARPE-19 (células del epitelio pigmentario de la retina) humanas que son estándar en el campo. La construcción que proporcionó una neutralización superior de las cepas VHL-1, TR y TB40/E de HCMV fue la construcción UL128C-MVA que tiene gH de longitud completa como uno de los insertos.

En otro modo de realización descrito en el ejemplo 2, se puede evaluar la inmunización con 1974-MVA-UL128C de MR no infectados con RhCMV y la caracterización de las respuestas de AcN. El rMVA generado en este ejemplo puede usarse para inocular a MR por vía intradérmica. Se administrarán dos dosis de UL128C-MVA separadas por 6 semanas a cada uno de los 6 MR, seguidas de 6 semanas adicionales antes de obtener los sueros y la saliva para estudios *in vitro*. Los sueros y la saliva obtenidos de MR inmunizados se utilizarán para bloquear la infección por aislados de HCMV que contienen la región de virulencia de ULb' y que expresan el pentámero UL128C. Se llevará a cabo una evaluación de la función de AcN producidos en MR de control y vacunados para interferir con la infección por HCMV de células ARPE-19 (epitelio pigmentario de la retina) y fibroblastos humanos primarios. Se usarán aislados experimentales y virulentos de HCMV como desafío infeccioso en células ARPE-19 incubadas al mismo tiempo con sueros o saliva de MR inmunizados y controles.

En otro modo de realización descrito en el ejemplo 3, pueden insertarse las proteínas de HCMV, pp65 y gB en MVA-BAC y estudiarse la expresión, estabilidad e inmunogenicidad de esta construcción de manera similar que con UL128C-MVA. Se puede administrar pp65-gB-MVA y UL128C a MR cada 6 semanas en forma de mezcla o por separado. Se medirán los AcN específicos de HCMV utilizando procedimientos *in vitro* usando células ARPE-19 o fibroblastos primarios. Pueden medirse los títulos que previenen la infección por HCMV con el objetivo de encontrar que las vías de infección por HCMV tanto de Epi/EC como de fibroblastos son inhibidas por AcN estimulados por la vacuna. Puede evaluarse una vacuna alternativa en la que todas las subunidades de UL128C y pp65/gB se insertan en un solo MVA-BAC, para determinar que las subunidades se expresan por igual y la

estabilidad genética. Esta vacuna se administrará a MR, y la neutralización *in vitro* de HCMV se realizará en células ARPE-19 y en fibroblastos humanos primarios.

## EJEMPLOS

5

Los siguientes ejemplos ilustran que los 5 miembros de UL128C de HCMV pueden expresarse simultáneamente en una versión derivada de BAC de un vector MVA clínicamente relevante para estimular AcN que previenen la infección de células Epi/EC. Estos ejemplos incluyen al menos las siguientes observaciones: (1) la tecnología de BAC se puede aplicar para diseñar rápidamente MVA que expresen UL128C de RhCMV de manera eficiente en una sola célula; (2) la inmunización de MR con MVA-RhCMV-UL128C produce títulos biológicamente relevantes de AcN que neutralizan cepas epiteliotrópicas de RhCMV; (3) la tecnología de BAC es efectiva para expresar un UL128C de HCMV de 5 miembros funcional en una sola célula; (4) la cepa 1974-MVA clínicamente aprobada puede clonarse en un BAC; y (5) el uso de MR negativos para RhCMV para analizar la generación de AcN que bloquean la infección de células Epi/EC humanas por HCMV, (6) los resultados del desafío en MR. (7) UL128C de HCMV en MVA genera AcN en ratones que neutralizan diferentes cepas de HCMV con tropismo por Epi/EC (TB40/E, VHL-1, TR, otras) en células ARPE.

10

15

20

25

30

35

40

MVA-BAC es superior a las estrategias anteriores, ya que su uso elimina las derivaciones en serie de virus modificados progresivamente y la purificación en placas de células eucarióticas durante entre 5 y 10 pases que requieren meses o incluso años para expresar de forma estable múltiples genes. Por el contrario, el sistema BAC permite la modificación de genomas grandes en un sistema bacteriano fácil de aplicar en el que meses de trabajo se pueden concentrar en semanas. Este enfoque puede ser la única estrategia manejable para expresar al mismo tiempo 5 o más genes a partir de un solo vector, cada uno con la misma secuencia promotora (mH5) o una diferente. La subunidad gB de HCMV también se puede insertar en MVA para inducir AcN que interfieren con la entrada en los fibroblastos como se demostró recientemente (Wang et al. 2004; Abel et al. 2010). Independientemente de que el vector final contenga únicamente miembros de UL128C o una combinación con pp65 y gB, este enfoque de manipulación genética de MVA en el sistema de BAC representa un cambio significativo con respecto a los enfoques tradicionales y amplía la aplicabilidad de MVA para que sea óptimo para complejos de múltiples componentes requeridos para la producción de AcN que reconocen epítopos conformacionales como UL128C por ejemplo. Dado que se ha demostrado que los MR son capaces de generar una respuesta de AcN funcionales contra pp65 y gB de RhCMV (Abel et al. 2010) y contra RhUL128C (Wussow et al, 2013), generar AcN en respuesta a la vacunación con UL128C- + gB-MVA de HCMV que neutralizarán los aislados de HCMV en un sistema de análisis *in vitro* también debería ser eficaz.

### **Ejemplo 1: Una vacuna que induce anticuerpos ampliamente neutralizantes en macacos rhesus no expuestos a CMV que inhiben las entradas principales de la infección por CMV de macaco rhesus**

45

50

55

60

65

*Virus y células.* La propagación de MVA en células de riñón de hámster recién nacido (BHK), y la preparación y almacenamiento de soluciones madre de virus se realizaron de acuerdo con protocolos publicados anteriormente (Wang et al. 2010). Se mantuvieron fibroblastos de embrión de pollo (CEF) para la propagación de MVA en medio de producción de virus sin suero (VP-SFM; Invitrogen).

Se generaron MVA que expresaban el pentámero de longitud completa de 5 subunidades RhUL128, RhUL130, RhUL131, RhgL y RhgH (MVA-RhUL128C), MVA que expresaban el pentámero de 5 subunidades con una versión alternativa sin dominio transmembrana (TM) de gH (MVA-RhUL128CΔ), o MVA que expresaban las subunidades RhUL128, RhUL130 y UL131A por la tecnología de BAC como se describe a continuación. Se generaron MVA que expresaban RhUL128 o RhUL130 por separado mediante la estrategia de manipulación convencional en células eucarióticas como se describió anteriormente (Wang et al. 2007). La construcción de MVA-RhgB con un dominio TM eliminado se ha descrito anteriormente (Yue et al. 2008). Para estos estudios se realizaron cuatro pases sucesivos en células MKE para la cepa UCD59 de RhCMV con tropismo por células epiteliales, que contiene una región UL/b' de longitud completa, que incluye el locus RhUL128-UL131A intacto (número de registro de GenBank EU130540: originalmente registrada como cepa 22659) (Oxford et al. 2008). La cepa 68.1 de RhCMV (ATCC) se propagó en fibroblastos de macaco rhesus telomerizados (Telo-RF) (Oxford et al. 2011). Las células MKE se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM: F12; Invitrogen) suplementado con suplemento de crecimiento de células epiteliales (ScienCell), piruvato sódico 1 mM, HEPES 25 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y suero fetal bovino al 2 %/SuperSerum (Gemini Bio-Products). Las células Telo-RF se mantuvieron como se describe Abel et al. (2011). Todas las células se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad.

60

65

*Plásmidos de transferencia.* Los plásmidos de transferencia para insertar casetes de expresión génica de cada uno de los genes de RhCMV en MVA-BAC por mutagénesis «*en passant*» se generaron de la siguiente manera. Primero, las secuencias de codificación sintéticas libres de intrones para RhUL128, RhUL130 o RhUL131A (GenScript), así como las secuencias de codificación amplificadas por PCR para RhgL y RhgH de la cepa UCD59 de RhCMV (números de registro de Genbank EU130540.1, HQ667932.1 y HQ667933.1) se insertaron individualmente mediante los sitios de restricción PmlI y AscI entre el promotor de virus vaccinia H5 modificado (mH5) y la señal de terminación de la transcripción Poly-T (5'TAT) de plásmido pZero2-mH5 (Wang et al. 2010). La

secuencia de codificación para RhUL130 se sintetizó con dos cambios de nucleótidos C a T en las posiciones 99 y 102 del ORF en comparación con la secuencia publicada. Para la generación de RhgHΔTM, los primeros 690 codones de RhgH se amplificaron por PCR con un cebador inverso que proporciona una secuencia codificante en el extremo 3' (GAG CAG AAA CTG ATA TCT GAA GAG GAC CTC TGA; SEQ ID NO:1) para el epítipo del marcador myc EQK LIS EED L (SEC ID NO: 2).

A diferencia de RhUL128, los ORF de RhUL130, RhUL131A, RhgL y RHgH se insertaron con secuencias Kozak en el extremo 5' (GCC ACC ACC (RhUL130 y RhUL131A; SEQ ID NO: 3), GCC GCC CCG (gL; SEC ID NO: 4), o GCC GCC ACC (gH; SEC ID NO: 5)) que preceden a los codones de inicio ATG. En la siguiente etapa de clonación, el marcador de resistencia a kanamicina (Kan<sup>R</sup>) *aphAI* y el sitio de restricción de endonucleasa de asentamiento («*homing*») I-SceI del plásmido pEPkan-S2 (Tischer et al. 2006), se amplificaron por PCR con cebadores que proporcionaron duplicaciones de genes de 50 pb y se insertaron en sitios de restricción únicos de los genes clonados. Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el casete *aphAI*-I-SceI y el sitio de restricción utilizado para clonar el producto de la PCR se muestran en la tabla 1 a continuación. En las construcciones resultantes, los casetes *aphAI*-I-SceI de los genes estaban flanqueados por duplicaciones de genes de 50 pb (fig. 1A). Todos los insertos clonados fueron confirmados por secuenciación. Las secuencias completas de todos los plásmidos de transferencia están disponibles previa solicitud.

**Tabla 1.** Cebadores de clonación.

Cebador para la clonación de <i>aphAI</i> -I-SceI y la duplicación de genes en genes de RhCMV		
Gen <sup>A</sup>	Secuencias de los cebadores (5'a 3') <sup>B</sup>	Sitio <sup>C</sup>
UL128	<u>GTACAATTGGTTCCTTAAGAAGCTCCTAGAATATGGAAAAAATGATACTT</u> <u>ATCTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT</u> (SEQ ID NO:6)	MfeI
	GCCCAATTGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC (SEQ ID NO:7)	
UL130	<u>CGGTACCCTCTAGCGTCACGATATAGTTCGGCCTGGCTGTTTAGGCGG</u> <u>CATTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT</u> (SEQ ID NO:8)	KpnI
	CGGTACCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC (SEQ ID NO:9)	
UL131	<u>GTACAATTGTTGGAAAAAATAATTAATGCGTCAGTCTCGTATCATTACGC</u> <u>TACTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT</u> (SEQ ID NO:10)	MfeI
	GCCCAATTGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC (SEQ ID NO:11)	
gH	<u>GTACTGCAGAAAGAAGAGCCATATTTGCATTTGAAACAGGACTGTGCTC</u> <u>TCTATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT</u> (SEQ ID NO:12)	PstI
	GCCCTGCAGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC (SEQ ID NO:13)	
gL	<u>GTACACGTGTGTAGATAATGTGTGCCGCGCTACGACCTTCGATATCTC</u> <u>ACATTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT</u> (SEQ ID NO:14)	PmlI
	GCCCACGTGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC (SEQ ID NO:15)	

<sup>A</sup> Gen diana clonado en pZero2-mH5.

<sup>B</sup> Cebador para amplificar *aphAI*-I-SceI de pEPkanS2. Las secuencias subrayadas proporcionaron la duplicación del gen de 50 pb.

<sup>C</sup> Sitio de restricción utilizado para insertar el casete *aphAI*-I-SceI en el gen de RhCMV respectivo.

*Mutagénesis «en passant»*. Los genes de RhCMV clonados se insertaron en el MVA-BAC mediante mutagénesis «*en passant*» basada en la recombinación mediada por Red de dos pasos en la cepa GS1783 de *E. coli* de acuerdo con el protocolo publicado (Tischer et al., 2010). En resumen, las secuencias de los genes con el promotor mH5 aguas arriba, la señal de terminación de virus vaccinia corriente abajo y el casete *aphAI*-I-SceI flanqueado por una duplicación del gen de 50 pb, se amplificaron mediante PCR a partir de los plásmidos de transferencia pZero2-mH5 con cebadores que contenían extensiones de 50 pb para recombinación homóloga, y se introdujeron en el genoma viral mediante una primera recombinación mediada por Red (fig. 1A). Después de eso, el marcador de selección Kan<sup>R</sup> se escindió limpiamente de los genes insertados mediante la introducción de una rotura de doble cadena del ADN en el sitio I-SceI por expresión de la enzima de asentamiento y una segunda recombinación mediada por Red posterior de las duplicaciones de los genes de 50 pb (fig. 1A). Mediante la aplicación sucesiva de estas reacciones, los cinco genes de RhCMV se insertaron sucesivamente en cuatro sitios de inserción de MVA tradicionales como se muestra en la fig. 1B. Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los casetes de expresión, así como los sitios de inserción de genes, se muestran en la Tabla 2 a continuación.

**Tabla 2.** Cebador para la recombinación mediada por Red

Cebador para la recombinación mediada por Red de los casetes de expresión de los genes de RhCMV en MVA-BAC

Gen <sup>A</sup>	Secuencias de los cebadores (5'a 3') <sup>B</sup>	Sitio <sup>C</sup>
UL128	<u>AAAAAATATATTATTTTTATGTTATTTTGTAAAAATAATCATCGAATACTAT</u> AAAAATTTTTATGGCGCG (SEQ ID NO:16)	Del2
	<u>GAAGATACCAAAATAGTAAAGATTTTGCTATTCAGTGGACTGGATGATTGG</u> AAAAATTGAAAATAAATACAAAGG (SEQ ID NO:17)	
UL131	<u>TTGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCATTGATTTTTA</u> TGAAAAATTGAAAATAAATACAAAGG (SEQ ID NO:18)	IGR3
	<u>ATTCCGAAATCTGTACATCATGCAGTGGTTAAACAAAAACATTTTTATTCTAT</u> AAAAATTTTTATGGCGCG (SEQ ID NO:19)	
gH	<u>ATATGAATATGATTTTCAGATACTATTTTGTTCCTGTAGATAATAACTAATA</u> TAAAAATTTTTATGGCGCG (SEQ ID NO:20)	G1L/I8R
	<u>GTGGAAAAATTTTCATCTCTAAAAAAGATGTGGTCATTAGAGTTTGATTTT</u> TATGAAAAATTGAAAATAAATACAAAGG (SEQ ID NO:21)	
UL130	<u>TTGGGGAAATATGAACCTGACATGATTAAGATTGCTCTTTCGGTGGCTGG</u> TATAAAAAATTTTTATGGCGCG (SEQ ID NO:22)	extremo izquierdo del vector BAC en Del3
	<u>TACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTGGCCGGCC</u> GAAAAATTGAAAATAAATACAAAGG (SEQ ID NO:23)	
gL	<u>CAAAGTGGATGAATTCCCAGATCCGGCCTTGCCGGCCTCGAGGGCCGGC</u> CGAAAAATTGAAAATAAATACAAAGG (SEQ ID NO:24)	extremo derecho del vector BAC en Del3
	<u>ACAAAATTATGATTTTGTCTATCAACTACCTATAAACTTTCCAAATATAT</u> AAAAATTTTTATGGCGCG (SEQ ID NO:25)	

<sup>A</sup> Gen de RhCMV clonado en pZero-mH5 y que contiene un casete interno de *aphA1*-I-Scel flanqueado por una duplicación del gen de 50 pb.

<sup>B</sup> Cebador para la amplificación del casete de expresión del gen clonado en pZero2. Recombinación mediada por las secuencias subrayadas.

<sup>C</sup> Sitio de inserción en MVA del casete de expresión en MVA-BAC.

5 *Reconstitución de virus.* La reconstitución de virus a partir de los MVA-BAC se realizó en células BHK utilizando el reactivo de transfección Fugene HD de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche) de forma similar a los procedimientos descritos anteriormente (Cottingham et al. 2008; Domi y Moss 2002). Primero, el ADN de BAC se purificó a partir de células GS1783 de *E. coli* con el Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> células BHK se sembraron en un formato de seis pocillos y se transfectaron 16-20 h más tarde con 2 µg de ADN de BAC purificado mediante los complejos lipídicos Fugene HD. Las células se infectaron 4 horas después con el virus de la viruela aviar HP1.441 (Mayr y Malicki 1966) (proporcionado amablemente por Bernard Moss, NIAID) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. Después de 2 días de incubación, las células se diluyeron en una proporción

10

de 1 a 2, y la reconstitución del virus se controló por la expresión de GFP y la formación de placas. La etapa de dilución se puede repetir hasta que más del 90 % de la monocapa celular quede infectada.

*Antisueros policlonales.* Se generaron antisueros policlonales de conejo contra las proteínas de RhCMV con el Express Complete Peptide Polyclonal Antibody Package de GenScript contra las siguientes secuencias peptídicas: Se usó CID SDS YPY EED IDG (SEC ID NO: 26) para el antisuero contra RhUL128; CTP RSA PAK QVA PKP (SEQ ID NO: 27) para el antisuero contra RhUL130; CVR PGE IDE CLY RQQ (SEQ ID NO: 28) para el antisuero contra RhUL131; CFT GET FSP EDD SW (SEQ ID NO: 29) para el antisuero contra RhgL; y HNS TKC NNN GTR RNC (SEQ ID NO: 30) para la generación del antisuero contra RhgH.

*Transferencia Western (WB).* La WB se realizó de manera similar a los protocolos estándar publicados (Wang et al. 2004). En resumen, se infectaron células BHK confluentes al 80-90 % sembradas en placas de 6 pocillos con MVA a una MOI de 0,1. Después de 36-40 h, las células se recogieron y se centrifugaron a 300 g, y los lisados celulares totales se prepararon en 200 µl de tampón de muestra SDS (SDS al 2 %, ditioneitol 100 mM (DTT) o β-mercaptoetanol al 10 % y Tris-HCl 125 mM/pH 8,8). Para detectar proteínas secretadas en el medio, se infectaron monocapas confluentes de células CEF en placas de 6 pocillos a una MOI de 0,1 y se cultivaron durante 36-40 h en 2 ml de medio de producción de virus sin suero (VP-SFM; GIBCO). El medio se recogió, se aclaró por centrifugación a 300 g y se concentró aproximadamente 20 veces utilizando las centrifugas de filtración Amicon® Ultra (10 MWCO, Millipore). El medio concentrado se preparó luego para la WB mezclando con tampón de muestra SDS concentrado 5 veces. Se prepararon lisados de células CEF infectadas tal como se describe para las células BHK. Las muestras se hirieron y se separaron por electroforesis en porciones de 10-20 µl de las proteínas desnaturizadas en geles de SDS al 10 % en poliacrilamida, luego se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se aplicaron antisueros policlonales de conejo en una dilución de 1/5000. Se usó anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-myc en una dilución de 1/1000. Se empleó un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en una dilución de 1/50.000. Las bandas de proteínas se visualizaron finalmente por detección quimioluminiscente (Pierce).

*Co-inmunoprecipitación (Co-IP).* Se infectaron células BHK (80-90 % confluentes) en una placa de cultivo tisular de 100 cm<sup>2</sup> con MVA-RhUL128Δ a una MOI de 5 y se incubaron durante 16-22 h. Las células se recogieron en PBS enfriado en hielo y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis celular enfriado en hielo que contenía 1 % (p/v) de Triton X-100, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) NaCl 300 mM, etilendiaminotetraacetato 4 mM (EDTA), 0,02 % (p/v) de azida de sodio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF) y comprimidos de cóctel inhibidor de proteasas Complete Mini (Roche). Después de incubar durante 30 minutos en hielo, los residuos celulares se eliminaron por centrifugación a ~10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El lisado celular se aclaró previamente durante 30 minutos a 4 °C con perlas de Protein A/G PLUS-Agarose e IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology). En paralelo, se incubó perlas de Protein A/G PLUS-Agarose y 1-2 µg de clon de anticuerpo de ratón anti marcador c-myc 4A6 (Millipore) o anticuerpo IgG de ratón irrelevante de control durante 2 h en PBS enfriado en hielo, se lavó 2 veces en PBS, y luego se combinó con 500 µl de lisado celular aclarado previamente. La mezcla se incubó durante 2 horas o toda la noche a 4 °C. Después de eso, las perlas de agarosa se lavaron 3 veces en PBS y se hirieron en 50 µl de tampón de muestra SDS. Las muestras (10-20 µl) se analizaron mediante WB como se describe anteriormente.

*Animales.* Para estos estudios se utilizaron macacos rhesus (*Macaca mulatta*) genéticamente modificados del Centro Nacional de Investigación de Primates de California (CNPRC), confirmados repetidamente como seronegativos para RhCMV. Su edad era de aproximadamente de 1-2 años en el momento de la inoculación con RhCMV. Los animales fueron alojados por parejas al menos dos semanas antes de la inmunización, y permanecieron alojados juntos hacia el final del estudio 7 semanas después del desafío. El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de California, Davis (UC Davis), que está totalmente acreditado por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio, aprobó todos los protocolos con animales antes de cualquier procedimiento.

*Inmunización y desafío.* Grupos de 4 MR (3 MR para MVA-RhUL130) se inmunizaron mediante inyección intramuscular con ~5 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de placa (UFP) de MVA purificado con 6 semanas de diferencia, como se describió anteriormente (Yue et al. 2008). Ocho semanas después de la segunda inmunización, se desafió a los animales mediante inyección subcutánea con 1 x 10<sup>3</sup> UFP de UCD59 de RhCMV de acuerdo con protocolos publicados previamente (Yue et al. 2008). La sangre, los hisopos bucales y las muestras de orina para la determinación de los títulos de AcN y las cargas virales se prepararon como se describió anteriormente (Yue et al. 2008).

*PCR en tiempo real.* Se extrajo el ADN del plasma y los hisopos bucales utilizando el procesador automatizado de ADN QIASymphony (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los protocolos publicados (Huff et al. 2003). El volumen de elución final fue de 300 µl. El ADN extraído se almacenó a -80 °C hasta que se realizó el análisis por PCR en tiempo real. Se detectaron las copias de ADN de UCD59 de RhCMV en plasma y en los hisopos bucales mediante un ensayo de PCR en tiempo real previamente descrito (Sequer et al. 2002).

*Ensayos de neutralización.* Los títulos de AcN de plasma de mono (anticoagulante EDTA) en fibroblastos se analizaron mediante el uso de células Telo-RF y la cepa 68.1 de RhCMV para la infección como se describió

anteriormente (Abel et al. 2011; Abel et al. 2008). Los AcN de las células MKE se determinaron como sigue. Brevemente, se incubaron 25 UFP de UCD59 con diluciones en serie semilogarítmicas (1:31 a 1: 100) de plasma inactivado por calor (56 °C, 30 min) en un volumen final de 500 µl de DMEM:F12 con 10 % de suero bovino fetal. Se incluyó una mezcla combinada de plasma de ocho monos rhesus no infectados con RhCMV como control negativo. La mezcla de virus/plasma se incubó durante 2 horas a 37 °C y luego se añadió por triplicado a monocapas de células MKE en placas de 24 pocillos (500 µl/pocillo), que se habían sembrado el día anterior a una densidad de  $6 \times 10^4$  células/pocillo. Las células de tres pocillos se incubaron solo con medio de crecimiento. Después de 4 horas de incubación, se eliminó la mezcla de virus/plasma y las células se lavaron dos veces con DMEM:F12, luego se cubrieron con agarosa al 0,5 % y 2 ml de medio de crecimiento. Después de 10-12 días, se contaron las placas. El título de neutralización (NT) porcentual para cada dilución se calculó de la siguiente manera:  $NT = (1 - (\text{número de placas con plasma inmune}) / (\text{número de placas con plasma de control negativo})) \times 100$ . El título que dio un 50 % de reducción de las placas (título NT50) se calculó determinando la pendiente lineal de la gráfica que representa el NT frente a la dilución del plasma.

*Análisis de los datos.* Los números de copias de la carga viral se resumieron para cada animal como el área bajo la curva (AUC) total durante 16 semanas después del desafío. El AUC entre dos puntos de tiempo sucesivos (T1 y T2, en semanas) se calculó como el área del trapecio formado por las cargas virales (VL) en esos dos tiempos, de acuerdo con la siguiente fórmula:  $AUC \text{ (entre T1 y T2)} = 1/2(VL_{T1} + VL_{T2}) \times (T2 - T1)$ . La suma de las mediciones de las AUC individuales representó el AUC total para cada animal.

*Análisis estadístico.* Se calcularon las pruebas de suma de rangos unilateral y bilateral para las diferencias estadísticas entre los grupos por la prueba de Wilcoxon.

*Ensamblaje de RhgH/gL/UL128-UL131A en un solo vector MVA.* Para ensamblar casetes de expresión de los cinco genes de RhCMV dentro de un único genoma de MVA, se utilizó un MVA-BAC en combinación con la inserción de secuencias sin marcadores por mutagénesis «*en passant*» (Cottingham et al. 2008; Tischer et al. 2010; Tischer et al. 2006). El MVA-BAC se construyó mediante la inserción de secuencias del vector pBeloBAC11 junto con un casete de expresión de GFP en el sitio de delección 3 (Del3) de MVA (Cottingham et al. 2008). Usando construcciones de transferencia correspondientes, los cinco genes de RhCMV que incluyen un promotor mH5 del virus vaccinia aguas arriba y una señal de terminación de la transcripción aguas abajo se introdujeron en serie en 4 sitios de inserción de MVA conocidos por mutagénesis «*en passant*» en la cepa GS1783 de *E. coli* sin marcadores de selección bacterianos (fig. 1A). Se insertaron casetes de expresión para RhUL128, RhUL131A o RhgH, bien en una forma de longitud completa (FL) o en una forma con el TM eliminado (RhgHΔTM), en el sitio de delección II (Del2), región intergénica 3 (IGR3) (Manuel et al. 2010), y el sitio de inserción entre los ORF esenciales G1L e I8R (Wyatt et al. 2009), respectivamente (fig. 1B). Además, se introdujeron casetes de expresión para RhUL130 y RhgL en el sitio Del3 en ambos extremos del vector BAC (fig. 1B). La construcción con el TM eliminado se generó con el razonamiento de que la expresión de un RhUL128C soluble aumentaría la inmunogenicidad (Endresz et al. 2001; Wang et al. 2004, 61). Para facilitar el análisis de RhUL128C, el TM C-terminal eliminado de RhgH se reemplazó por una secuencia de codificación en marco para un marcador de epítipo c-myc. Todas las demás subunidades, incluida RhgH de longitud completa, no se modificaron para evitar alterar la formación de RhUL128C (Lilja y Shenk 2008). Cada uno de los genes yuxtapuestos a cada uno de los casetes del promotor mH5 se insertaron en sitios de inserción separados en orientaciones de transcripción opuestas para permitir una expresión transgénica similar reduciendo al mismo tiempo el riesgo de recombinación homóloga intermolecular e intramolecular entre los elementos promotores (fig. 1B). Las secuencias de RhgH se insertaron en el sitio G1L/I8R porque se ha descrito que este sitio favorece la propagación estable de secuencias grandes o tóxicas, como las proteínas o las glicoproteínas que contienen dominios transmembrana (Wyatt et al. 2009). La integridad del genoma de MVA clonado, así como la inserción sin marcadores de los genes de RhCMV, se confirmó mediante análisis de fragmentos de restricción, PCR y secuenciación (no se muestran datos). Estos resultados demostraron que la mutagénesis «*en passant*» permitió la inserción rápida y precisa de las cinco subunidades de RhUL128C en un único genoma de MVA clonado como un BAC.

*Recuperación de MVA que expresa RhgH/gL/UL128-UL131A.* Para recuperar los viriones de MVA que expresaban al mismo tiempo RhgL/gH/UL128-UL131A, con o sin el TM de gH, denominados MVA-RhUL128C y MVA-RhUL128CΔ, el ADN de MVA-BAC se transfectó en células BHK para reconstituir el virus en presencia del virus auxiliar de la viruela aviar (FPV) (Cottingham et al. 2008; Domi y Moss 2002). FPV es necesario para iniciar la maquinaria de transcripción a partir del ADN "desnudo" de MVA, pero no experimenta recombinación con el genoma de MVA ni establece una infección productiva en células BHK (Cottingham et al. 2008; Domi y Moss 2002). La recuperación de MVA se confirmó después de 4-5 días de cultivo celular mediante la observación del efecto citopático (CPE) y la formación de placas de células que expresan el gen GFP que procede de la construcción BAC (no se muestran datos) (Cottingham et al. 2008). Las células BHK infectadas con los virus reconstituidos se analizaron luego por Western Blot (WB). Usando antisueros policlonales de conejo que se generaron contra secuencias peptídicas de cada una de las subunidades de RhUL128C, se confirmó la expresión de los 5 genes de RhCMV insertados para ambos vectores MVA (fig. 2A). Los tamaños de proteína detectados fueron ~55 kD para RhUL128, ~43 kD para RhUL130, ~23 kD para RhUL131, ~32 kD para RhgL y ~95 kD para RhgH. Todos los tamaños de proteína eran mayores que los tamaños de proteína calculados teóricamente basándose en la composición de aminoácidos, lo que sugiere que todas las subunidades de UL128C de RhCMV se modifican

postraduccionalmente en las células BHK (Lilja y Shenk 2008). Las dos formas de RhgL que migran más rápido probablemente pueden explicarse por proteínas no procesadas que requieren O-glicosilación como proceso de maduración postraduccional tardía, como se ha demostrado para el VHS (fig. 2A) (Johnson y Spear 1983). Como se esperaba, la eliminación del TM dio como resultado la expresión de RhgH con un peso molecular más bajo que la RhgH de longitud completa (fig. 2). También se generaron MVA que expresaban solo una, dos o las tres proteínas de las subunidades RhUL128-UL131A con la asistencia de la tecnología de BAC (fig. 2B). La coexpresión de todas las subunidades de la proteína RhUL128C dio como resultado un aumento de las cantidades citoplásmicas de UL128-UL131A, lo que podría explicarse por el aumento de la estabilidad o de la expresión (fig. 2B). Se generaron MVA con insertos de un solo gen en 2-3 semanas, y se generaron MVA-RhUL128C y MVA-RhUL128CΔ en 4-5 meses. En conclusión, la tecnología de BAC se utilizó con éxito para generar rápidamente vacunas de MVA que expresan solo subconjuntos o los cinco genes de RhUL128C.

*Coexpresión estable de RhgH/gL/UL128-UL131A en MVA.* Como siguiente paso, se investigó la estabilidad de la expresión genética y proteica de MVA-RhUL128C tras la propagación del virus. Se realizaron 5 pases de MVA-RhUL128C en células BHK y los niveles de expresión relativos de los 5 genes de RhCMV insertados se determinaron por WB después de cada pase del virus. Se confirmaron cantidades constantes de las cinco proteínas de RhCMV durante los 5 pases del virus MVA-RhUL128C (fig. 3). La expresión estable de los genes RhCMV insertados también se confirmó durante 5 pases del virus MVA que coexpresaba RhUL128, RhUL130 y RhUL131A (no se muestran datos). Además, la expresión únicamente del gen RhUL128 por un vector de vacuna generado por la tecnología de BAC o por un vector de vacuna derivado de la estrategia de transfección/infección de MVA convencional demostró niveles de expresión similares en 10 pases de virus (no se muestran datos) (Earl et al. 2001). Estos resultados demostraron que MVA-RhUL128C coexpresaba de forma estable todos los genes de RhCMV durante los pases sucesivos del virus y que MVA derivado de BAC proporcionaba una estabilidad de inserción comparable a los recombinantes derivados convencionales. En consecuencia, el pentámero y otros MVA recombinantes con subunidades de RhCMV se consideraron adecuados para la expansión a gran escala para preparar disoluciones madre para estudios de inmunización.

*Interacción de las subunidades de RhUL128C.* Para demostrar la formación del pentámero RhUL128C, se analizaron las interacciones entre las proteínas RhgH/gL/UL128-UL131A expresadas por MVA por co-inmunoprecipitación (co-IP). Las células BHK infectadas con MVA-RhUL128CΔ se recolectaron y procesaron para la IP de RhgHΔTM mediante detección con anticuerpo monoclonal anti-marcador c-myc. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por WB utilizando antiseros policlonales para la detección de cada una de las subunidades de RhUL128C. La IP de RhgHΔTM resultó en la co-IP de todas las demás subunidades de RhUL128C (RhgL, RhUL128, UL130 y UL131A) (fig. 4). (Ver Wussow et al. 2013). Estos resultados demuestran que RhgHΔTM interactúa con RhgL y RhUL128 cuando se coexpresan a partir de MVA-RhUL128CΔ, lo que proporciona evidencia de interacciones clave que conducen a la formación de un RhAM128C pentamérico.

*Secreción mejorada de RhgHΔTM tras la coexpresión con RhgL y RhUL128-UL131A.* Ryckman et al. demostraron, utilizando vectores de expresión basados en adenovirus, que la secreción de una gH con TM eliminado (gHΔTM) se potencia mediante la coexpresión de todas las subunidades del pentámero UL128C (Ryckman et al. 2008b). La interacción de las subunidades que forman el complejo del pentámero RhUL128C de RhCMV se caracterizó de manera similar, comparando la eficacia de secreción de RhgHΔTM expresada por MVA sola o en combinación con RhgL, o con RhgL y UL128-UL131A (MVA-RhUL128CΔ). El enfoque fue analizar el medio concentrado libre de suero y los lisados celulares de células CEF infectadas con construcciones de MVA por WB usando antisero policlonal anti-gH. Como se esperaba, la coexpresión de todas las subunidades de RhUL128C (MVA-RhUL128CΔ) conduce a los niveles más altos de secreción de RhgHΔTM cuando se compara con su expresión sola o en combinación con gL (fig. 5). Además, las cantidades secretadas de RhgHΔTM expresada sola, o en combinación con RhgL, o en combinación con todas las demás subunidades de RhUL128C fueron mayores que las de RhgH de longitud completa coexpresadas junto con todas las demás subunidades de RhUL128C (MVA-RhUL128C) (fig. 5), lo que sugiere que la presencia del TM de RhgH anclaba los complejos a la superficie celular. De manera interesante, el tamaño de RhgHΔTM o RhgH detectable en el medio fue ligeramente mayor que el observado en los lisados celulares (en relación con el marcador de tamaño de 95 kD), lo que sugiere que las formas secretadas de RhgH (con o sin TM) se modifican postraduccionalmente de manera diferente que en células equivalentes. Junto con los datos anteriores de co-IP, estos resultados reafirman que la coexpresión de RhgHΔTM con RhgL y RhUL128-UL131A conduce a un complejo pentamérico que promueve una mayor secreción de RhgHΔTM, lo que es consistente con los estudios de una forma soluble de gH de HCMV (Ryckman et al. 2008b).

*Inducción de AcN específicos de Epi/EC en MR vacunados con MVA-RhUL128C.* Para lograr el objetivo central del programa de vacunas, se investigó la capacidad de MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ para generar AcN en MR. Dos grupos de cuatro monos negativos para RhCMV se inmunizaron dos veces cada uno, con 6 semanas de diferencia, bien con MVA-RhUL128C o con MVA-RhUL128CΔ (N = 4 MR/vacuna). También se usaron MVA que expresaban RhUL128 o RhUL130 (N = 3 MR) solas, o MVA que coexpresaban RhUL128-UL131A para la inmunización. Los títulos de AcN que dieron una neutralización del 50 % (NT50) se determinaron en células epiteliales de riñón de mono (MKE) utilizando la cepa UCD59 de RhCMV para la infección. Como controles adicionales se analizaron muestras de plasma de monos inmunizados con RhgB o el marcador bacteriano gus en un procedimiento de refuerzo con MVA de inmunización primaria/doble con ADN de un estudio previo (Abel et al.

2011). Los títulos NT50 de MR vacunados con MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ dos semanas después de la vacunación fueron comparables al rango normativo de NT50 de MR infectados de forma natural y oscilaron entre 108 y 402 (mediana 146) o entre 88 y 513 (mediana 209), respectivamente (fig. 6A). El rango normativo del NT50 de UCD59 medido en células MKE para monos de 3 a 4 años alojados en corrales es de 67-1060 (mediana 662) (Yue *et al*, no publicado). Por el contrario, los títulos NT50 de MR vacunados con MVA que expresan solo subunidades de RhUL128C o RhgB permanecieron por debajo del límite de detección del ensayo (fig. 6A). Solo un animal del grupo de MVA-RhgB tenía un título de NT50 de 72 (fig. 6A). En consecuencia, los títulos de AcN medidos en células MKE de MR vacunados con MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ fueron significativamente más altos que los del grupo de control de MVA-venus, y también de todos los otros grupos de vacunas (fig. 6A). A las 6 semanas de la segunda inmunización, los títulos NT50 disminuyeron y oscilaron entre 70 y 101 (mediana 79) para monos inmunizados con MVA-RhUL128C y de 36 a 94 (mediana 56) para los animales vacunados con MVA-RhUL128CΔ. Estos títulos de AcN todavía estaban en el extremo inferior o ligeramente por debajo del rango normativo de NT50 determinado en células MKE. Los títulos de AcN determinados para los grupos de vacunas de MVA-RhUL128C y MVA-RhUL128CΔ no fueron significativamente diferentes ( $p = 0,69$  a las 2 semanas y  $0,2$  a las 6 semanas) (fig. 5B). Estos resultados indican que es necesaria la coexpresión de las 5 subunidades de RhUL128C, expresadas con una forma de gH transmembrana anclada o soluble, para obtener AcN específicos de células epiteliales.

*Generación de AcN específicos de fibroblastos en MR vacunados con MVA-RhUL128C.* El plasma de MR inmunizados con vacunas de MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ se analizó para determinar su capacidad para inhibir la infección de fibroblastos telomerizados de macaco (Telo-RF) con la cepa 68-1 de RhCMV. Sorprendentemente, ambas construcciones de vacunas indujeron una fuerte actividad de AcN que prevenían la infección por RhCMV de células Telo-RF (fig. 6C). Dos semanas después de la segunda inmunización, el plasma de MR inmunizados con MVA-RhUL128C demostró títulos NT50 de 590 a 785 (mediana de 608), y los sueros de animales vacunados con MVA-RhUL128CΔ tuvieron un título NT50 de mayor magnitud en el rango de 450 a 864 (mediana 732). Estos títulos NT50 estaban en el rango normativo de NT50 de los MR infectados de forma natural medidos en Telo-RF, que varía de 231 a 3348 para animales infectados a largo plazo (Abel *et al.* 2011). En particular, AcN medidos en Telo-RF de MR vacunados con MVA-RhUL128C o MVA-RhUL128CΔ en la semana 2 después de la vacunación fueron significativamente más altos que los de MR vacunados con MVA-RhgB (3 veces,  $p = 0,01$ ) y los de animales con vacunación de control ( $p = 0,005$ ) de un estudio previo (fig. 6C). Seis semanas después de la segunda inmunización, los títulos de AcN disminuyeron, pero aún variaron de 160 a 383 (mediana de 216) para los MR vacunados con MVA-RhUL128C y de 148 a 350 (mediana de 226) para los animales del grupo de vacuna de MVA-RhUL128CΔ. Los AcN en la semana seis todavía se mantuvieron en el extremo inferior o ligeramente por debajo del rango normativo de los valores de NT50 medidos en fibroblastos (fig. 6D). Al igual que con el título de AcN medidos en células MKE, los títulos de AcN determinados en Telo-RF de los grupos de vacunas de MVA-RhUL128C y MVA-RhUL128CΔ no fueron significativamente diferentes ( $p = 0,49$  y  $0,89$ ) (fig. 6). En comparación con RhUL128C con gH de longitud completa, la eliminación del TM de gH para generar complejos solubles no mejoró los títulos de AcN de las células MKE y los fibroblastos de macaco. Estos resultados inesperados demuestran que MVA que expresan gH/gL/UL128-UL131A de RhCMV inducen una actividad de AcN que no solo inhibe la entrada en Epi/EC, sino que sorprendentemente también bloquea la infección de fibroblastos por RhCMV.

*Reducción de la carga viral en MR vacunados con MVA-RhUL128C después del desafío con RhCMV.* A continuación se evaluaron los 2 grupos de vacunas de MVA que expresaban diferentes formas de RhUL128C que generaron actividad de AcN para determinar su eficacia protectora frente al desafío con RhCMV. Los MR inmunizados con MVA-RhUL128CΔ o MVA-RhUL128C se inocularon por vía subcutánea 2 semanas después de la inmunización de refuerzo (en la semana 6) con la cepa de RhCMV epiteliotrópica UCD59 (Oxford *et al.* 2011). Para servir como control, los animales no vacunados también fueron desafiados. El número de copias del genoma de RhCMV se midió luego mediante qPCR en plasma y en muestras de hisopos bucales obtenidas cada 1 a 2 semanas. La fig. 7 presenta la carga viral en plasma acumulada del virus de desafío UCD59 determinada calculando el área bajo la curva (AUC) en un intervalo de tiempo de 16 semanas que comienza en el momento del desafío. Mientras que la carga viral en plasma de los animales inmunizados con MVA-RhUL128C (mediana del AUC del número de copias del genoma = 584) fue 21 veces menor que la de los MR de control (mediana del AUC del número de copias del genoma = 12.652), la carga viral de los animales vacunados con MVA-RhUL128CΔ (mediana del AUC del número de copias del genoma = 5247) fue solo 2,4 veces menor que la de los animales no vacunados de control. La carga viral de la mayoría de los MR vacunados con MVA-RhUL128C fue menor que en los MR no vacunados ( $p = 0,03$ ). Tres de los cuatro animales vacunados con MVA-RhUL128C tenían un número muy bajo o nulo de copias de RhCMV en plasma (fig. 7). Por el contrario, dos MR del grupo de vacuna de MVA-RhUL128CΔ no mostraron carga viral, pero los otros dos tenían una carga viral alta (fig. 7). En consecuencia, los autores no pueden inferir ninguna mejora en la carga viral de los MR vacunados con MVA-RhUL128CΔ en comparación con los controles ( $p = 0,33$ ), ni ninguna diferencia con el grupo de MVA-RhUL128C ( $p = 0,64$ ). Sin embargo, la combinación de los dos grupos de vacunas y la comparación de las cargas virales con los animales de control no vacunados arroja una probabilidad significativa de  $p = 0,07$ , muy cercana a la significación estadística inequívoca. Estos datos indican que la vacunación de MR no expuestos a RhCMV con MVA-RhUL128C redujo la carga viral en plasma en la mayoría de los MR a los que se administró un virus de desafío virulento. Los resultados

de AcN y del desafío son indicadores sólidos de que el pentámero UL128C será un componente necesario para una vacuna profiláctica exitosa para los monos y, lo que es más importante, para los humanos.

5 Epi/EC desempeñan un papel fundamental para la entrada, difusión, persistencia y transmisión de HCMV de un huésped a otro (Sinzger et al. 2008). Una estrategia de vacuna para la prevención efectiva de la infección por HCMV probablemente dependerá de la capacidad de inducir AcN potentes que inhiban la entrada del virus en estos tipos de células (Revello y Gerna 2010; Schleiss 2010). Las estrategias de vacunación anteriores basadas en gB recombinante o Towne no lograron obtener un título alto de AcN que inhibiera la infección por HCMV de Epi/EC (Cui et al. 2008). Dado que las proteínas UL128-UL131A que forman un complejo de virión pentamérico con gH/gL son necesarias para la entrada en Epi/EC y sirven como dianas de AcN potentes en individuos seropositivos para HCMV, estas proteínas se han propuesto como dianas de vacunas para la inmunización primaria (Gerna et al. 2008; Hahn et al. 2004; Macagno et al. 2010; Wang y Shenk 2005b). Los estudios descritos anteriormente demuestran que los MVA que coexpresan los cinco equivalentes en RhCMV de UL128C de HCMV inducen AcN que bloquean de manera potente la infección viral de células MKE y fibroblastos de macaco. Una vacuna que exprese estas proteínas puede ser una candidata efectiva para inhibir múltiples rutas de entrada de HCMV.

Al combinar la tecnología de BAC con la inserción de secuencias sin marcadores por la mutagénesis «*en passant*» (Cottingham et al. 2008; Tischer et al. 2010), los casetes de expresión para los 5 genes de RhCMV podrían insertarse rápidamente en sitios de inserción separados de un solo genoma de MVA (fig. 1). Un enfoque comúnmente utilizado basado en la recombinación homóloga en células eucarióticas con los laboriosos procedimientos de cribado posteriores habría llevado considerablemente más tiempo para generar estos recombinantes (Earl et al. 2001). Esta es la primera descripción de MVA con casetes de expresión génica en 5 sitios de inserción distintos, lo que lleva a MVA a una nueva categoría para el diseño de vacunas con antígenos múltiples. MVA-RhUL128C mantuvo la expresión estable de los cinco genes de RhCMV durante 5 pases de virus (fig. 3), lo que indica que esta construcción de vector es un candidato factible para el desarrollo de vacunas. Si bien cada una de las subunidades de UL128C podría expresarse a partir de vectores separados, la administración simultánea a una sola célula para permitir el ensamblaje del pentámero funcional será difícil de lograr en un entorno *in vivo* en lugar de en un entorno de laboratorio *in vitro*. Se identificó un enfoque óptimo para el ensamblaje y la función del pentámero que tiene profundas consecuencias de traslacionales como componente básico de una vacuna contra HCMV.

La evaluación de la vacuna contra HCMV en modelos animales puede estar limitada debido a la estricta especificidad de especie de los CMV, pero los CMV de roedores y sus respectivos huéspedes continúan sirviendo como modelos animales vitales para desarrollar posibles vacunas para HCMV. Dado que el CMV de cobaya (gpCMV) infecta al feto de forma transplacentaria, el modelo de gpCMV/cobaya es particularmente útil para diseñar estrategias de vacunas para la infección congénita (Schleiss 2010). Además, la evaluación de la vacuna de RhCMV en MR representa un modelo de primate no humano para desarrollar estrategias de vacunas análogas a las dirigidas contra HCMV (Barry et al. 2006; Yue et al. 2003). Desde una perspectiva evolutiva, los MR son los animales más cercanos a los humanos que se pueden investigar experimentalmente (Barry et al. 2006). Además, el contenido del genoma y los patrones de persistencia viral y patogénesis del huésped de RhCMV se parecen mucho a los de HCMV, con la salvedad de que no se ha verificado la transmisión transplacentaria de RhCMV (Barry et al. 2006; Schleiss 2010). Sin embargo, a diferencia de los CMV de roedores, RhCMV codifica un conjunto completo de ortólogos de UL128, UL130 y UL131A de HCMV (Hansen et al. 2003; Lilja y Shenk 2008; Oxford et al. 2008; Rivallier et al. 2006; Schleiss et al. 2008; Yamada et al. 2009).

Algunos investigadores han demostrado que las proteínas de fusión marcadas o los péptidos derivados de UL128, UL130 o UL131A inducen AcN específicos de Epi/EC contra HCMV en ratones o conejos (Adler et al. 2006; Saccoccio et al. 2011; Wang y Shenk 2005b), sugiriendo que estas subunidades de UL128C podrían ser suficientes para generar actividad de AcN en humanos. Sin embargo, la generación de inmunidad en animales pequeños contra un xenoantígeno puede reflejar solo una propiedad inmunológica en lugar de una inmunidad dirigida contra CMV de huésped restringido. Esta conclusión se basa en el hecho de que las secuencias de péptidos UL130 y UL131A utilizadas para generar AcN en conejos no se unieron a los anticuerpos séricos de seropositivos para HCMV (Saccoccio et al. 2011), lo que sugiere que estos epítomos lineales únicos no serían inmunogénicos en humanos. Además, con la excepción de un solo anticuerpo caracterizado contra UL128, todos los otros AcN monoclonales humanos caracterizados que inhiben exclusivamente la entrada de HCMV en Epi/EC, son epítomos conformacionales diana caracterizados por dos o más subunidades de UL128C (Genini et al. 2011; Macagno et al. 2010). Los resultados descritos aquí son consistentes con la dependencia mencionada anteriormente de la coexpresión de múltiples subunidades de UL128C para producir AcN funcionales para inducir actividad de neutralización de RhCMV específica de Epi/EC en MR comparable a la inducida después de una infección natural (fig. 6). La adición de RhgH/gL es probablemente importante para anclar las subunidades restantes de RhUL128C y estabilizar la formación de los epítomos conformacionales (Ryckman et al. 2008a; Ryckman et al. 2008b). En consecuencia, las observaciones en el sistema de RhCMV son análogas a los estudios de HCMV, y sugieren con fuerza la similitud de la función de los UL128C de ambas especies y la necesidad de formar un pentámero para generar AcN efectivos. Los datos analizados anteriormente apoyan que los pentámeros UL128C deben ser parte de una vacuna profiláctica integral contra HCMV que puede usarse sola o con uno o más determinantes de

neutralización adicionales (por ejemplo, RhgB, RhgM/gN, RhgO) y/o una o más dianas principales de la inmunidad celular (por ejemplo, Rhpp65 o RhIE1). Además, se puede administrar una vacuna profiláctica integral contra HCMV en combinación con cofactores adicionales, moléculas estimuladoras de células B (por ejemplo, CD40L).

5 Los MR no expuestos a CMV vacunados con RhUL128C deben generar AcN que inhiban la infección por RhCMV de células MKE, porque el pentámero RhUL128C es análogo a la versión humana de UL128C. Sin embargo, un hallazgo adicional e inesperado fue el descubrimiento de que podían producirse AcN en MR vacunados con RhUL128C que inhibían la infección de fibroblastos de macaco por RhCMV. Estas observaciones sugieren que la construcción de vacuna descrita en el presente documento es capaz de estimular simultáneamente AcN contra los complejos UL128C y gH/gL. Igualmente notable es que los títulos de AcN medidos en MKE o fibroblastos fueron comparables a los observados en monos seropositivos para RhCMV (Fouts et al. 2012; Macagno et al. 2010; Urban et al. 1996). Significativamente, los AcN generados en MR vacunados con MVA-RhUL128C que inhibían la infección de fibroblastos de macaco por RhCMV tenían títulos 3 veces mayores que los AcN generados en animales vacunados con MVA-RhgB como se describió previamente (Abel et al. 2011) (figura 6C). También se confirmó que los MR vacunados con MVA-RhgB desarrollaron solo niveles mínimos de AcN que inhibían la infección por RhCMV de células MKE (figura 6A), lo que apoya firmemente que MVA-RhUL128C es superior a MVA-RhgB para inducir AcN que inhiben la entrada de RhCMV tanto en fibroblastos como en Epi/EC. Estos resultados amplifican el análisis reciente de la globulina hiperinmune de CMV que demostró que los AcN que inhiben la entrada en Epi/EC o fibroblastos actúan principalmente sobre los epítomos de los complejos UL128C o gH/gL, y que los AcN contra gB desempeñan un papel menor en la inhibición de la entrada de HCMV en ambos tipos de células (Fouts et al. 2012). Estos datos respaldan las estrategias de vacunación contra HCMV basadas en UL128C y/o gH/gL, ya que son más efectivas que las estrategias que solo se basan en gB para generar AcN que bloquean la infección de múltiples tipos de células. Sin embargo, una combinación de los dos enfoques puede proporcionar actividades de AcN mayores y más amplias que las estrategias basadas solo en uno de estos determinantes de neutralización importantes.

En resumen, la tecnología de MVA-BAC se examinó en combinación con la inserción de secuencias sin marcadores mediante mutagénesis «*en passant*» para generar MVA que coexpresaban de manera estable los cinco equivalentes en RhCMV de UL128C de HCMV, que son necesarios para la entrada del virus en Epi/EC. Se encontró que los MR negativos para RhCMV inmunizados con estas vacunas no solo desarrollaban una fuerte actividad de neutralización que prevenía la infección de las células epiteliales por RhCMV, sino que también desarrollaron una fuerte actividad de AcN que inhibían la infección de fibroblastos. Además, el título de AcN medido en ambos tipos de células fue comparable al de los monos infectados de manera natural. Además, los MR inmunizados demostraron una menor carga viral en plasma. Este estudio es valioso por al menos las siguientes razones: (1) se confirmó que las 5 subunidades de UL128C son suficientes para inducir AcN que inhiben la infección por RhCMV tanto de Epi/EC como de fibroblastos, aunque cada una de las subunidades UL128, UL130 o UL131A por separado o sus combinaciones no lo son; (2) los títulos de AcN son igualmente fuertes si el sustrato de infección son Epi/EC o fibroblastos, lo que sugiere que una vacuna única compuesta por subunidades de UL128C puede eliminar la necesidad de una vacuna de la subunidad gB; (3) se determinó que las vacunas contra HCMV que actualmente se están evaluando clínicamente deben incorporar componentes de UL128C para prevenir la transmisión horizontal o se corre el riesgo de que sean inadecuadas para la tarea de prevenir la infección por el CMV de las dos entradas de infección principales, reduciendo su efectividad (Bernstein et al. 2009 ; Griffiths et al. 2011; Khafan-Dabaja et al. 2012; Pass et al. 2009).

#### 45 **Ejemplo 2: Construcción y expresión de pentámero UL128C de HCMV expresado por MVA**

*Expresión por MVA de subunidades de UL128C humano.* Se generaron MVA que expresaban el pentámero de 5 subunidades UL128, UL130, UL131, gL y gH humanas de longitud completa (H-UL128C-MVA) mediante tecnología de BAC similar a la descrita en el ejemplo 1.

50 Como se muestra en la fig. 8, las 5 subunidades de UL128C humano (H-UL128C) se expresaron con éxito, según se evaluó mediante AcM (gH, UL128, UL130) o antisueros policlonales (UL131A, gL) que se usaron para detectar subunidades individuales. El PM de cada una de las subunidades es acorde a los valores publicados, y proporciona pruebas sólidas de que la expresión basada en MVA es fiel a la estructura de estas subunidades expresadas por HCMV. En la fig. 8 también se ilustran composiciones en las que se coexpresan estructuras de gH alternativas (por ejemplo, gH con un dominio transmembrana eliminado, gHΔTM) con las otras 4 subunidades de H-UL128C (una composición con la gHΔTM alternativa se muestra en UL128CA, y gH de longitud completa (gH-FL) se muestra en UL128C). El complejo pentamérico puede investigarse para determinar las propiedades funcionales evaluadas *in vitro* utilizando un procedimiento de inhibición de la infección de una línea celular epitelial por HCMV (Ryckman et al. 2008a). Este experimento se puede realizar utilizando líneas celulares ARPE-19 y MRC5, utilizando dos virus MVA diferentes, H-UL128C-MVA y gB-MVA. Este estudio *in vitro* debe confirmar la actividad funcional de H-UL128C expresado por MVA y debe ser un modelo efectivo para los estudios de AcN descritos aquí.

65 *Interacción de las subunidades de H-UL128C.* Para demostrar la formación del pentámero H-UL128C, se analizaron las interacciones entre las proteínas gH, gL y UL128-UL131A humanas expresadas por MVA por co-inmunoprecipitación (co-IP) (fig. 9). Las células BHK infectadas con MVA-H-UL128C se recolectaron y procesaron

por IP de gH con anticuerpo monoclonal de ratón anti-gH 14-4b o anticuerpo de control irrelevante acoplado a proteína A/G agarosa. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por WB utilizando antisueros policlonales para la detección de cada una de las subunidades de RhUL128C. Los resultados de la fig. 9 muestran la co-IP de las 5 subunidades de UL128C después de IP de la proteína gH. Esto demuestra que las subunidades individuales de H-UL128C interactúan entre sí, formando un pentámero funcional cuando se coexpresan a partir de MVA.

### **Ejemplo 3: Construcción y evaluación de un MVA-BAC clínicamente aceptable para uso humano**

Los estudios preclínicos que utilizaron RhCMV fueron facilitados por un vector MVA-BAC construido anteriormente (Cottingham 2008). Todas las vacunas que utilizan componentes de RhCMV se ensamblaron utilizando este MVA-BAC. Sin embargo, dado que se desconocen los orígenes de MVA, se utilizará un vector de vacuna diferente para uso humano. Este MVA-BAC también se construirá de manera que las secuencias de vectores se puedan eliminar después de la reconstitución del virus para evitar la permanencia de cualquier secuencia bacteriana funcional no deseada, una propiedad que probablemente requerirá la FDA para su aprobación. Los elementos del vector se insertarán en el locus TK para reconstruir los sitios de inserción disponibles para la expresión transgénica. La construcción de un MVA-BAC para uso en humanos se realizó utilizando el 1974-MVA, que proporcionó el Dr. Bernard Moss del NIAID. El uso clínico de este MVA ha permitido el desarrollo de múltiples vacunas, muchas de las cuales están ahora en ensayo clínico. Por lo tanto, 1974-MVA debería ser seguro para su uso en humanos. En la fig. 10 se muestra un esquema para construir un MVA-BAC autoescindible basado en 1974-MVA (1974-MVA-BAC). Se desarrolló un mapa de sitios de restricción para predecir los tamaños de los fragmentos generados por las enzimas de restricción (ER) de 6 pb que tienen perfiles conocidos en el genoma de 1974-MVA completamente secuenciado (no se muestran datos). El perfil de las ER es compatible con el rescate de un clon genómico de longitud completa de MVA. Para demostrar la función de 1974-MVA después de la clonación en BAC, se insertaron casetes de expresión de mRFP en tres sitios de inserción conocidos de MVA, y los 1974-MVA-BAC resultantes se usaron para transfectar células BHK-21. La fig. 11A muestra placas virales que presentan la expresión de proteína roja (casete de expresión insertado) y verde (casete de expresión de GFP contenida en el vector BAC) en monocapas de CEF que demuestran la expresión funcional y la producción de virus por el clon BAC después de la transfección de CEF y la producción de virus. Además, el nuevo MVA-BAC se ha utilizado para la generación de un CD40L que expresa MVA recombinante, que se utilizará en diferentes dosis para mejorar las respuestas de anticuerpos al pentámero UL128C después de la inmunización de ratones.

Se evaluaron tres sitios de inserción de 1974-MVA-BAC utilizando 3 antígenos de prueba de proteínas de CMV humano diferentes. Los 3 sitios de inserción expresan el gen HCMV insertado en la proteína (fig. 11B), lo que demuestra la integridad funcional de 1974-MVA-BAC y su capacidad para ser modificado con subunidades de UL128C de HCMV y su aplicación a estudios de vacunación.

La tecnología de MVA-BAC se utilizó para ensamblar un RhCMV-UL128C funcional que induce AcN que inhiben la infección de células epiteliales por un aislado de RhCMV natural (UCD59) con una región de virulencia UL/b' funcional. También se puede desarrollar una construcción de MVA-BAC similar del equivalente del complejo pentamérico UL128C humano y esta construcción puede evaluarse en MR negativos para RhCMV. Si bien la restricción de la gama de huéspedes de HCMV impide realizar un estudio de desafío en MR, se puede extraer el suero de MR vacunados y evaluar su capacidad para inhibir la infección por HCMV de células ARPE-19 permisivas con el virus como criterio indirecto de evaluación clínica. Probablemente una vacuna de protección total deba inhibir la infección por el virus simultáneamente en las vías de endocitos y de fibroblastos, lo que puede resolverse desarrollando construcciones de MVA adicionales que expresen gB sola o combinada con UL128C. Se puede investigar la infección de MR y la evaluación de la inhibición por parte de AcN en suero de la infección *in vitro* de fibroblastos y células ARPE-19. En última instancia, las investigaciones llevadas a cabo realizando ensayos clínicos pueden establecer mejor la capacidad de estas construcciones de HCMV para prevenir o limitar la infección o la viremia. Las personas que serían candidatas para la vacunación incluyen, pero no se limitan a, mujeres en edad fértil, adolescentes que excretan VHCM o no han estado expuestos y se beneficiarían de la inmunización al interrumpir la posibilidad de transmitir la infección en casa y de infectar a una madre no infectada en edad fértil. Todos estos individuos son candidatos para la inmunización con los vectores descritos en los modos de realización de esta solicitud de patente.

### **Ensamblaje de Hu-UL128C en 1974-MVA-BAC, análisis *in vitro* de la expresión y la función.**

Los datos descritos anteriormente demuestran que la expresión de UL128C de RhCMV en MVA es válida usando un modelo homólogo de MR negativos para RhCMV en el que se demuestra que se forman AcN específicos de RhCMV después de la inmunización con UL128C-MVA (Ejemplo 1). Esto proporcionó una sólida evidencia que guió el desarrollo de UL128C utilizando los genes de HCMV y la expresión en MVA, lo que se demuestra en la fig. 8 (ejemplo 2). Además, la inmunoprecipitación de gH seguida de un análisis por WB con anticuerpos monoclonales para la detección de gH, UL128 y UL130 demostró el ensamblaje de las subunidades de UL128C expresadas a partir de MVA (fig. 9) (ejemplo 2). Para lograr la relevancia traslacional que acompaña a la producción de una vacuna para uso humano, el vector debe asociarse con un MVA que haya sido aprobado por la FDA en lo que respecta a su seguridad en estudios de evaluación clínica. En consecuencia, 1974-MVA se insertó en un vector BAC autoescindible (fig. 10) y su funcionalidad se demostró *in vitro* (fig. 11). A continuación, se pueden insertar las

cinco subunidades de UL128C de HCMV en 1974-MVA-BAC, y se miden la expresión, la función y la estabilidad de las subunidades. La respuesta eficaz a la vacuna acompañada de un análisis de la seguridad deben respaldar contundentemente la aprobación de la FDA para realizar estudios clínicos con la misma vacuna de HCMV-MVA que se investiga en MR.

5

*Construcción y ensamblaje de HCMV 1974-MVA-BAC.* El 1974-MVA-BAC construido como se describe en la fig. 10 puede usarse para insertar cinco antígenos de UL128C como se ha descrito para el MVA-BAC que se muestra en la fig. 1A. También se pueden usar otros sitios de delección o regiones intergénicas para el ensamblaje del pentámero UL128C o transgenes adicionales como gB, pp65 o IE. MVA-BAC generalmente requiere un virus auxiliar para iniciar la replicación que se resuelve de la forma más conveniente mediante el uso de un virus de la viruela aviar no replicante de calidad BPFc (FPV, obtenido del Dr. Bernard Moss, LVD, NIAID) en CEF permisivos de la replicación de MVA. Después, el vector ensamblado se evalúa de manera similar a la de las figs. 2 a 5, ya que cada subunidad se inserta exitosamente, luego es expresada por MVA. Se puede realizar una WB para determinar el perfil de expresión de todas las subunidades coexpresadas. Las subunidades UL128, UL130, UL131A, gL y gH se insertan en ese orden en el 1974-MVA-BAC. La inserción final de gH se puede lograr usando dos formas de la glicoproteína: la forma  $\Delta$ TM o la forma FL. La etapa final del análisis de expresión de la construcción pentamérica puede ser la expresión simultánea de las 5 subunidades. El objetivo es un nivel de expresión aproximadamente igual de cada subunidad, ya que la hipótesis de trabajo sugiere una proporción igual de las subunidades en el complejo pentamérico final. Los niveles de expresión de todas las subunidades pueden normalizarse con referencia al antígeno BR5, que no debería mostrar diferencias en los niveles de expresión, independientemente de la composición de los antígenos de la vacuna de MVA (fig. 2). Ambas construcciones pentaméricas (UL128C-1974-MVA y UL128C $\Delta$ -1974-MVA) pueden estudiarse individualmente para determinar su función *in vitro* e *in vivo* para determinar cuál genera mejor neutralización de los aislados de HCMV.

10

15

20

25

30

UL128C-1974-MVA-BAC puede producirse en CEF, un sustrato celular aceptable para la FDA. Esta opción puede requerir la obtención de un aislado de FPV que tenga una procedencia rastreable no expuesto al agente de la enfermedad de las vacas locas (EEB). Dado que las células CEF son permisivas con FPV, puede llevarse a cabo la inactivación del virus usando una combinación de psoraleno y luz UV como se describió previamente (Lubaki et al. 1994). Alternativamente, se pueden usar células BHK-21, que no son permisivas con la infección por FPV, aunque es necesario un banco celular maestro registrado por la FDA.

35

40

45

50

*Inhibición funcional de la infección por HCMV de células ARPE-19 permisivas por la expresión de UL128C.* Se puede demostrar que H-UL128C-MVA previene la infección por el virus endoteliotrópico HCMV TB40/E (u otras cepas de virus con tropismo intacto por Epi/EC como TR, VHL-1, etc.), de Epi/EC permisivas como las células ARPE-19, o HUVEC. Este ensayo funcional es importante para establecer criterios de éxito para generar AcN, ya que puede detectar el ensamblaje correcto de un complejo pentamérico que interfiere con la infección de las células ARPE-19 por HCMV. Este estudio puede llevarse a cabo con controles adecuados, como gB y subunidades individuales de H-UL128C expresadas por MVA seguido de infección de las células de fibroblasto (MRC-5) para establecer la especificidad de la inhibición de la infección por HCMV TB40/E. Esto establece las condiciones en las que una monocapa de células ARPE-19 o MRC-5 expresa GFP a partir de H-UL128C-MVA (1974) o MVA de control (variar MOI de 1-5), antes de investigar la inhibición de la infección por HCMV. Alternativamente, se puede usar una monocapa de células ARPE-19 con expresión de GFP uniforme si la coexpresión de las subunidades de H-UL128C inhibe la infección por TB40/E versión mCherry de células ARPE-19 con un rango de MOI entre 1-100 UFP/célula. Estos ensayos pueden realizarse en placas de 96 pocillos para conservar el virus, y para cada condición, se pueden contar las placas en 6 pocillos idénticos mediante fluorescencia roja y/o AcM anti HCMV-IE. Se pueden utilizar las siguientes condiciones: H-UL128C-MVA, gH/gL-MVA, UL128/130/131-MVA, gB-MVA o GFP-MVA. Se debería observar una inhibición significativa de la infección por TB40/E únicamente con UL128C-MVA, y solo se debería observar una inhibición mínima o nula con cualquier otro MVA en las células ARPE-19. Por el contrario, las células MRC-5 pueden ser permisivas con la infección por TB40/E con inhibición moderada (~40 %) por gH/gL-MVA evaluada por tinción con AcM anti Hu-IE.

55

60

65

En caso de que la prevención de la infección por TB40/E sea exitosa, también se puede examinar la inhibición de la infección usando otros aislados de HCMV naturales heterólogos (TR o Toledo) para evaluar la capacidad para prevenir la infección de una cepa hetero-subtípica.

*Análisis de estabilidad de UL128C-MVA evaluada por WB y qPCR.* La estabilidad tras el pase de UL128C-MVA se puede medir mediante un procedimiento que se describió previamente (Wang et al. 2010). El análisis de estabilidad es importante porque los pases son necesarios para la amplificación de virus suficientes para el uso futuro en MR o en humanos. Se pueden realizar diez pases sucesivos de UL128C-MVA, junto con la titulación de los virus, el análisis de la expresión y el análisis genético de cada pase. La estabilidad se basa en la evaluación de los niveles de expresión de cada uno de los cinco insertos de HCMV y el antígeno de MVA-BR5 en cada pase en comparación con el virus fundador denominado P0. Los niveles de expresión de cada antígeno insertado pueden compararse en cada pase y compararse con el antígeno BR5 para evaluar el grado de estabilidad. Dado que pueden ocurrir pequeños cambios en la estabilidad que reflejan observaciones comunes con MVA (Wyatt et al. 2009), una disminución de la señal de  $\leq 20$  % respecto al virus fundador en el P0 se define como aceptable. También se puede medir cualquier variación genética que se acumule después de los pases. Usando los mismos procedimientos para

el pase de virus descritos anteriormente, en cada pase se realiza un análisis basado en qPCR de cada antígeno, así como del antígeno TK endógeno que forma parte de UL128C-MVA ensamblado. Se puede aceptar una señal de qPCR que se reduzca  $\leq 20\%$  en el P10 en comparación con el P0. Los detalles del enfoque de la qPCR para la cuantificación del inserto se pueden encontrar en un estudio anterior. Los cebadores para cada uno de los 5 insertos y el gen MVA-TK pueden derivarse de la información de las secuencias y validarse utilizando el ADN original de MVA-BAC que contiene los cinco insertos y el gen MVA-TK. Este control positivo también se puede usar para desarrollar una curva de patrones para estimar el número de copias en cada pase de UL128C-MVA.

Además, se puede secuenciar todo el UL128C-MVA para demostrar su estado inalterado después del pase por el paso intermedio de MVA-BAC estableciendo su idoneidad como candidata a vacuna humana.

### **Función inmunitaria del pentámero HCMV UL128C en ratones BALB/c.**

Animales y régimen de inmunización. Se puede usar un total de 200 ratones BALB/c hembra (> 2 meses de edad) para confirmar la expresión y la inmunogenicidad humoral de antígenos candidatos descritos en este ejemplo y en el ejemplo siguiente. El enfoque puede ser evaluar el suero de ratones inmunizados para detectar AcN que inhibirán la infección *in vitro* por HCMV de líneas celulares humanas sensibles. Los ratones pueden vacunarse con rMVA y pueden usarse extracciones de sangre prospectivas para evaluar la producción de AcN.

Es esencial realizar estudios de inmunización en ratones antes de los estudios de inmunización en MR al menos por dos razones. La primera razón es que deben confirmarse los vectores MVA con antígenos candidatos para determinar la expresión auténtica de la región codificante antes de los estudios en macacos. Estos estudios no se pueden realizar en cultivos de tejidos porque las pruebas de la formación de AcN requieren un sistema inmunitario intacto. Se estima que pueden construirse 10 vectores rMVA que expresen genes de HCMV y usarse para la infección de ratones (N = 10 ratones/construcción de rMVA). El número de ratones por grupo se basa en la experiencia previa para obtener resultados mínimamente consistentes que puedan evaluarse estadísticamente. Cada ratón puede ser inmunizado por vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular con rMVA espaciados por un intervalo mínimo de 3 semanas y se les puede extraer sangre periódicamente durante el transcurso de 180 días antes del sacrificio humano. Las extracciones de sangre de cada ratón pueden espaciarse al menos 2 semanas. La sangre se puede extraer de la vena caudal y se puede extraer un máximo de 0,25 ml/ratón cada vez (<1 % de peso corporal). El objetivo es comprobar qué rMVA produce AcN contra la infección por HCMV como se describe a continuación.

Los ratones BALB/c se inmunizaron por vía intraperitoneal o intramuscular dos veces con UL128C-MVA o UL128CΔ-MVA de HCMV que tenían una gH de longitud completa o una gH con dominio transmembrana eliminado para examinar los requisitos para generar AcN. Se empleó un régimen de inmunización en el que 4 ratones/grupo recibieron 10-50 millones de UFP de UL128C-MVA, UL128CΔ-MVA, UL128-UL130-UL131A-MVA, gL/gH-MVA, gB-MVA o venus-MVA de control (Wang et al. 2004a). Los ratones recibieron 2 inmunizaciones espaciadas por 3 semanas, y 1 semana después de cada inmunización y también 20 semanas después de la primera inmunización, se obtuvo suero para evaluar el contenido de AcN empleando la línea de células epiteliales ARPE-19 o de fibroblastos HFF-1. Aproximadamente 100 UFP de las cepas VHL-1, TB40/E o TR de HCMV se incubaron con sueros en dilución en serie semilogarítmica de ratones inmunizados, comenzando con una dilución de 1:100. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C y se añadió por triplicado a monocapas confluentes al 80-90 % de células epiteliales ARPE-19 o células de fibroblastos HFF-1 que se sembraron el día anterior en un formato de placa de 96 pocillos. Después de 22 horas de incubación, las células se tiñeron para determinar la expresión de IE1 y las células positivas se contaron al microscopio. Se analizaron los sueros de tres ratones no inmunizados como nivel basal para determinar el título de neutralización (NT) para cada dilución de la siguiente manera:  $NT = (1 - (\text{número de células positivas para IE1 con plasma inmune}) / (\text{número de células positivas para IE1 con plasma de control negativo})) \times 100$ . El título que dio una neutralización del 50 % (título NT50) se calculó determinando la pendiente lineal de la gráfica que representa el NT frente a la dilución de plasma (Wussow et al. 2013).

A la vista de las observaciones realizadas en MR vacunados con MVA-RhUL128C, es probable que el suero de ratones inmunizados con cualquiera de las dos vacunas de pentámeros contenga AcN que inhiban la infección de las células ARPE-19 y también de los fibroblastos MRC-5 con cepas de HCMV como TB40/E, TR, o Toledo. mientras que las cepas deficientes en la región UL/b' (AD169 y Towne) no serán infecciosas para las células ARPE-19. En cambio, los ratones infectados con gB-MVA deberían tener una menor actividad de neutralización en ambos tipos de células utilizando preparaciones de suero idénticas. Ninguno de los animales vacunados con subconjuntos de <5 subunidades de UL128C debería producir AcN. Además, pueden compararse UL128C-MVA que expresan gH-ΔTM o gH-FL para determinar cuál estimula una mayor cantidad de AcN. Los ratones inmunizados 2 veces se pueden inmunizar por tercera vez, 3-6 meses más tarde para investigar el aumento de los AcN ya existentes, como se hizo utilizando gB-MVA en un estudio previo (Wang et al. 2004a). Finalmente, se puede caracterizar una subclase de Ac IgG utilizando un kit comercial para estudiar la evolución de la especificidad de los anticuerpos generados por la inmunización. IgG2A debe ser predominante cuando hay una estimulación exitosa de AcN (Wang et al. 2004a).

El tiempo entre las inmunizaciones y el período posterior a la segunda inmunización se pueden aumentar para obtener suero si la neutralización es demasiado baja. Además, se puede agregar una tercera inmunización antes de los 3-6 meses propuestos y luego se puede obtener el suero para evaluar la neutralización.

## 5 **Inmunización de MR utilizando UL128C-MVA (1974) y caracterización de AcN.**

*Animales y régimen de inmunización.* Los animales pueden obtenerse de cohortes de reproducción no infectadas con RhCMV en corrales al aire libre en el Centro Nacional de Investigación de Primates de California (CNPRC). Los animales utilizados en los estudios descritos a continuación se alojan juntos en todas las partes de este proyecto. Este es un estudio no terminal con procedimientos mínimamente invasivos, y los animales pueden ser devueltos a la colonia del CNPRC al finalizar el estudio. Se puede usar aproximadamente el mismo número de machos y hembras, aunque el sexo del animal no es un factor determinante para la inclusión o exclusión en estos estudios.

Para este ejemplo se pueden inmunizar 30 macacos no infectados por RhCMV con vectores MVA recombinantes (N = 6 por vector), cada uno de los cuales expresa individualmente 1 de 3 vacunas de MVA con subunidades de UL128C diferentes (UL128C, gL/gH, UL128/130/131A), o un MVA de control. También se pueden usar MVA que expresan otras combinaciones de subunidades de UL128C. Además se puede inmunizar un quinto grupo (N = 6) con hasta 200 µg de viriones TB40/E de HCMV inactivados con formalina (FI-HCMV) con el adyuvante Montanide ISA 720, un adyuvante de aceite en agua, administrado por inyección intramuscular (IM).

El objetivo de este estudio es investigar el potencial de cada vector para obtener AcN funcionales. Los animales pueden inmunizarse por vía intramuscular (IM) tres veces en las semanas 0, 6 y 26 con  $5 \times 10^8$  UFP/dosis de MVA recombinante en PBS. Las muestras de sangre venosa y la saliva prospectivas pueden obtenerse de animales anestesiados (ketamina) utilizando protocolos estándar del CNPRC. Las extracciones de sangre se pueden realizar cada 1-4 semanas en el transcurso de 28 semanas (respecto a la inmunización primaria en la semana 0). Las extracciones de sangre no excederán las recomendaciones del CNPRC (12/mes/kg de peso corporal). La sangre puede procesarse para obtener plasma y monocitos de sangre periférica mediante protocolos estándar, y se pueden usar alicuotas para determinar el hemograma completo (HC) y los análisis bioquímicos de la sangre (Chem 20). En resumen, la saliva se recoge con 2 hisopos de Dacron colocados en el abazón. Cada hisopo se satura con 0,2 ml de saliva, y cada hisopo se coloca en un tubo que contiene 1,8 ml de PBS, lo que representa una dilución de la saliva de 1:10. Este volumen deja suficiente material para múltiples ensayos. La saliva se puede analizar en diluciones en serie semilogarítmicas a partir de la dilución recogida 1:10. La saliva puede procesarse para la evaluación de los títulos de AcN igual que las muestras de suero en COH. Los animales vacunados pueden alojarse juntos en un granero.

La expresión *in vitro* y los estudios de inmunización en animales pequeños relativos al UL128C validan la función y la capacidad de producir AcN del pentámero UL128C descrito en el presente documento. Sin embargo, el mejor modelo experimental para evaluar la capacidad para obtener AcN relevantes para enfermedades humanas es el estudio en primates. Por lo tanto, se pueden realizar estudios que usan MR negativos para RhCMV para evitar la posibilidad de reactividad cruzada con HCMV por parte de los AcN contra RhCMV ya existentes. El objetivo es llevar a cabo vacunaciones intramusculares (IM) tradicionales como se hizo anteriormente (Abel et al. 2010) y cuantificar los niveles de AcN utilizando la neutralización *in vitro* de HCMV (ver figuras 6 y 12). Puede investigarse la durabilidad de AcN en el suero y la mucosa (saliva), el número óptimo de vacunaciones, el nivel de dosis, el impacto de la estructura del antígeno gH en la frecuencia de AcN, la afinidad y la seguridad de la vacuna en MR que sean aplicables a los seres humanos. No solo se evalúan las propiedades funcionales de la vacuna en estos estudios, sino que se puede investigar la seguridad que es relevante para una futura solicitud a la FDA utilizando un virus idéntico fabricado con procedimientos de OGM. Otros estudios también pueden centrarse en un enfoque de vacuna óptimo para la inhibición *in vivo* del desafío viral utilizando una vacuna de RhCMV homóloga en MR negativos para RhCMV que incluya tanto UL128C como las subunidades gB/pp65 de RhCMV. Combinados, los resultados de los estudios sobre RhCMV y en humanos permitirán la traslación de una vacuna de HCMV que actúe sobre la infección congénita por HCMV.

*Regímenes de inmunización con MVA de MR negativos para RhCMV.* Se pueden estudiar cuatro vacunas de MVA con subunidades diferentes de UL128C (UL128C o UL128CΔ, gL/gH, UL128/130/131A) o gB-MVA o una vacuna de MVA-venus de control para determinar sus propiedades para generar AcN funcionales en el suero y la mucosa de MR vacunados. También pueden incluirse otras combinaciones de subunidades de UL128C expresadas por MVA como vectores de vacunas. Se pueden usar vacunas que utilicen MR negativos para RhCMV de entre 1 y 2 años. Para conseguir significación estadística, se incluyen 6 animales en cada grupo de vacunas, y se administran  $5 \times 10^8$  UFP/por dosis a cada animal dos veces, espaciadas por un intervalo de 6 semanas [Wussow et al, 2013]. Las extracciones de sangre y los hisopos de saliva se obtienen 2 semanas, 6 semanas, 3 meses y 6 meses después de la segunda vacunación para cada animal (ver la técnica de obtención en Animales vertebrados). A los 6 meses, se puede administrar una tercera vacunación y el suero y la saliva se obtienen 2 semanas después para comparar con AcN del suero y la saliva después de la segunda vacunación.

Alternativamente, se puede administrar una dosis de  $5,0 \times 10^8$  UFP/dosis dos veces, separadas por un intervalo de 6 semanas que se puede alterar para administrar menos vacuna de MVA ( $2,0 \times 10^8$  UFP) o una cantidad mayor ( $1,0 \times 10^9$  UFP). Estas cantidades propuestas funcionan de manera óptima en MR según los resultados anteriores.

5 *Evaluación de suero y saliva de MR inmunizados.* La neutralización *in vitro* puede ser la prueba principal para detectar la actividad de AcN. El objetivo de las mediciones de la neutralización es idéntico al de los estudios con ratones, y los virus a investigar y las líneas celulares a infectar pueden ser idénticas. Se puede introducir un cambio técnico en la dilución del suero de mono basándose en la previsión de que los títulos serán más bajos que en los estudios con ratones (1:31, 1: 100, 1: 300). Estas diluciones son consistentes con los títulos observados utilizando vacunas homólogas de RhCMV en MR (figura 6). Como controles positivos, se obtiene suero de cinco donantes de sangre humanos positivos para HCMV anónimos. Además, se sigue un procedimiento en el que se utilizan viriones inactivados con formaldehído TB40/E de HCMV (Abel et al. 2010) para inmunizar MR negativos para RhCMV (N = 6), y se puede extraer el suero y obtener saliva como controles positivos adicionales, como se describió recientemente (Wang et al. 2011). La saliva puede analizarse en diluciones en serie semilogarítmicas a partir de la dilución inicial 1:10 de forma similar a la dilución del suero. La medición de AcN con controles asociados debería ser lo más informativa respecto a la eficacia de UL128C-MVA de HCMV para provocar respuestas neutralizantes contra HCMV y una comparación de los títulos de AcN con los encontrados en humanos infectados de forma natural.

20 **Ejemplo 3: Ensamblaje de UL128C-MVA con gB en una vacuna o una combinación de 2 vacunas de MVA (UL128C + gB) para desarrollar AcN en MR para inhibir las vías de infección de fibroblastos y endocitos de HCMV.**

25 *Animales y régimen de inmunización.* Los estudios descritos anteriormente proporcionaron evidencia de que el RhUL128C por sí solo puede generar AcN que inhiben la infección de Epi/EC y fibroblastos (figura 6). Se pueden realizar estudios adicionales para combinar UL128C con gB/pp65 para potenciar o mejorar la inhibición de ambas vías de entrada de HCMV. Estos estudios pueden realizarse en 3 fases. En la primera fase, pueden inmunizarse macacos no infectados con RhCMV (N = 18 en total) con vectores MVA recombinantes (N = 6 por vector), cada uno de los cuales expresa individualmente 1 de 3 vacunas de MVA diferentes: N.º 1: 5-Ag de UL128C (determinado a partir del ejemplo 2) + gB/pp65; N.º 2: 5-Ag de UL128C solo; N.º 3: gB/pp65 solo. Para el grupo N.º 1, los animales pueden vacunarse con una mezcla de vacuna que contenga tanto el vector MVA con 5-Ag de UL128C como la construcción de gB/pp65-MVA. Además, puede realizarse una inmunización simulada de un grupo de control (N = 6) con un MVA de control. Los animales pueden inmunizarse por vía intramuscular (IM) tres veces en las semanas 0, 6 y 26 con  $5 \times 10^8$  UFP/dosis de MVA recombinante en PBS. En la segunda fase, los animales (N = 6) pueden inmunizarse IM en las semanas 0, 6 y 26, o bien con un complejo de MVA con 7-Ag que expresa los 5 miembros de UL128C y gB/pp65 dentro de una construcción de MVA. O bien los animales pueden inmunizarse con inmunizaciones independientes de MVA con 5-Ag y luego de gB/pp65-MVA. Para el último grupo, los animales pueden inmunizarse IM las semanas 0, 12 y 26 con MVA con 5-Ag, e inmunizarse con gB/pp65 las semanas 6, 18 y 32. Las muestras de sangre venosa y de saliva pueden obtenerse de animales anestesiados (ketamina) utilizando protocolos estándar. Las muestras se pueden tomar cada 1-4 semanas en el transcurso de 34 semanas (en relación con la inmunización primaria en la semana 0). Las extracciones de sangre no superarán los 12/mes/kg de peso corporal. La sangre puede procesarse para obtener plasma y monocitos de sangre periférica mediante protocolos estándar, y se pueden usar alícuotas para determinar el hemograma completo (HC) y los análisis bioquímicos de la sangre (Chem 20). La saliva se puede obtener pasando un hisopo de dacrón por las encías y los abazones y procesarse como se describe anteriormente. Este es un estudio no terminal con procedimientos mínimamente invasivos.

Para la tercera fase, los MR no infectados con RhCMV pueden inocularse por vía subcutánea (SC) con la formulación de vacuna preferente en múltiples sitios (N = 6) (determinada a partir de las fases 1 y 2 anteriores) o con MVA de control (N = 3). Se pueden tomar biopsias de piel de 1 cm de diámetro de los 9 animales en 1 sitio de inyección 3, 12, 26 y 52 semanas después de la inoculación inicial en la semana 0. Este es un estudio no terminal con procedimientos mínimamente invasivos. La vía de desafío por la que se administrará RhCMV a los MR vacunados en estudio puede ser a través de una entrada mucosa como la vía intranasal o intrarrectal o una ruta SC. El desafío también puede llevarse a cabo mediante la transmisión del virus por cohabitación con un compañero de jaula infectado.

60 *Fundamento.* La primera vacuna contra HCMV que demostró una eficacia del 50 % en un ensayo en humanos fue la proteína gB formulada en adyuvante MF59 (gB/MF59) (Pass et al. 2009). Por lo tanto, una estrategia que busque una eficacia > 50 % probablemente requerirá la inhibición de las dos vías de entrada de HCMV: Epi/EC y fibroblastos. Los estudios previos de RhCMV demostraron que gB era un componente necesario para generar AcN y contribuyó a la disminución de la excreción en el 50 % de los animales que también fueron vacunados con pp65 e IE1 expresadas por MVA (Abel et al, 2011). Sin embargo, no hay garantías de que la combinación de las vacunas para las dos vías, de fibroblastos y de Epi/EC, dé como resultado una inmunidad independiente y efectiva para inhibir ambas vías; o que pueda producirse una inhibición cruzada. No hay ningún precedente de evaluación de vacunas para generar AcN en el que se incluyan estas combinaciones de Ag específicos para UL128C y gB en la misma formulación. Por lo tanto, el mejor procedimiento para la administración de vacunas de MVA se puede

determinar mediante la realización de experimentos preliminares en ratones, seguidos de experimentos de confirmación en MR. Para este fin, se pueden combinar dos virus MVA, uno que exprese subunidades de UL128C, y el otro que exprese gB y pp65, para investigar si ambos complejos de antígeno pueden administrarse simultáneamente para estimular AcN con un nivel igual que con cada complejo de antígeno administrado por sí solo. Alternativamente, se puede determinar si la administración de UL128C-MVA y gB/pp65-MVA debe administrarse en inyecciones independientes espaciadas 6 semanas debido a la interferencia entre los dos complejos de antígenos. Suponiendo, no obstante, que no se encuentren interferencias en la generación de AcN específicos para las vías tanto de endocitos como de fibroblastos al incluir los siete antígenos en una sola formulación, se puede producir un MVA que exprese UL128C y gB como un enfoque conveniente de vacuna única, dirigido tanto a la vía endocítica como fibroblástica de entrada de HCMV. El papel de HCMV-pp65 en la protección requiere un modelo de desafío, ya que pp65 no estimula AcN. Además, se puede investigar la inserción de un séptimo gen (pp65) en UL128C-MVA manteniendo buena estabilidad para reflejar los componentes importantes (pp65/gB) del complemento de antígeno que obtuvo el mayor grado de protección contra la excreción en estudios anteriores (Abel et al. 2010). Las formulaciones y los regímenes pueden evaluarse en estos estudios como se describe en los ejemplos anteriores. El enfoque más traslacional incorpora todos los antígenos en una única vacuna de MVA que puede administrarse dos veces, ya que se encontró que es efectiva en los estudios de las vías de fibroblastos (Abel et al. 2010) y endocitos descritos anteriormente (ver figura 6).

*Construcción de UL128C + gB/pp65-MVA y expresión in vitro.* Pueden construirse MVA que expresen UL128C de HCMV como se describe en los ejemplos anteriores. Aunque existen construcciones de MVA que expresan pp65 y gB humanos, ambos genes pueden insertarse en 1974-MVA-BAC para mantener la coherencia. Los procedimientos descritos aquí son los mismos que los descritos en los ejemplos anteriores, y se usa el sitio G1 L/I8R para la inserción de gB- $\Delta$ TM e IGR3 para la inserción de pp65, ambos genes controlados usando un promotor mH5 como se muestra en la fig. 1B. A diferencia de gH, existe cierta dificultad para expresar gB-FL y la experiencia con gB- $\Delta$ TM sugiere que la construcción debería restringirse a una forma única de gB: gB- $\Delta$ TM (Wang et al. 2004a). Sin embargo, los recombinantes previos de MVA que expresan diferentes formas de gB se generaron en células eucarióticas utilizando un procedimiento de transfección de plásmidos por transferencia/infección con MVA, que no consiguió generar recombinantes estables que expresaran gB de longitud completa. Con la flexibilidad de la tecnología de BAC, ambas formas de gB (gB de longitud completa y con TM eliminado) se pueden ensamblar en un vector viral que permitirá investigar sus propiedades para mejorar la generación de anticuerpos. Además, se puede seleccionar un sitio adicional para la inserción de pp65 y/o gB en UL128C-1974-MVA-BAC de sitios que se han definido recientemente para la expresión transgénica eficiente y estable (Timm et al. 2006). Alternativamente, se pueden insertar dos antígenos en cada uno de los dos sitios de inserción conocidos (G1L/I8R, Del3) que se ha demostrado que permiten la propagación estable de secuencias muy grandes y/o tóxicas. La facilidad con la que se hacen nuevas construcciones en MVA-BAC (fig. 1) facilita el cribado rápido de sitios de inserción alternativos o la evaluación de insertos dobles en un sitio que mantiene genes con estabilidad que son equivalentes a UL128C-MVA. La simplicidad de agregar nuevos genes a BAC sin manipular un MVA multi-Ag durante la construcción del vector hará que el proceso sea mucho más simple que las alternativas en las que la adición del inserto requeriría un paso de transfección-infección eucariótica (Wang et al. 2008; Earl et al. 2007). No es probable que la construcción de pp65/gB-MVA sea problemática, y se puede llevar a cabo un estudio de estabilidad de 10 pases como se hizo para UL128C-MVA para asegurar la expresión adecuada y la estabilidad genética para la fase de fabricación del programa. Para amplificar la cepa pp65/gB-MVA con el fin de tener suficientes virus para los estudios con monos, es probable que se necesiten  $\leq 5$  pases. De manera similar, puede estudiarse el virus UL128C-MVA con los insertos pp65 y/o gB agregados para determinar la estabilidad de la expresión y la estabilidad genética mediante los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores. La producción de virus suficientes para los estudios en monos requiere  $\leq 5$  pases estables, pero los pases pueden extenderse durante aproximadamente 10 tandas para obtener información sobre la estabilidad a largo plazo de la construcción. Si bien no es probable que haya problemas con estas nuevas construcciones, la inserción de dos genes de glicoproteínas en un MVA debe evaluarse cuidadosamente para determinar la coexpresión y la estabilidad genética a fin de garantizar que ambas vías se inhiban por igual mediante la inducción de niveles equivalentes de AcN, que puede evaluarse como descrito aquí.

*Inhibición de la infección por HCMV mediante UL128C expresado por MVA.* Un objetivo importante es inhibir las vías de infección de HCMV de Epi/EC y fibroblastos utilizando formulaciones de vacunas con 6 o 7 Ag. La inhibición de la infección por HCMV de células Epi ARPE-19 puede modelarse después de la infección *in vitro* utilizando construcciones de MVA desarrolladas tanto para las vías de Epi/EC como de fibroblastos. Cualquier interferencia de H-UL128C con la infección por HCMV puede identificarse por las cepas de HCMV que infectan los linajes de Epi/EC y fibroblastos (TB40/E y TR), y evaluando la efectividad de H-UL128C-MVA para prevenir la infección. La tabla 4 muestra los resultados probables de los experimentos de inhibición *in vitro*. La prueba *in vitro* debe demostrar el ensamblaje exitoso de H-UL128C por su interferencia con la infección por HCMV de las células ARPE-19, y con controles adecuados, como los fibroblastos MRC-5, que deben infectarse en presencia de H-UL128C expresado, como han demostrado otros<sup>75</sup>. Si la coexpresión de gB/pp65 y H-UL128C en células ARPE-19 impide la interferencia por parte de H-UL128C en la infección de las cepas (TR y TB/40E) de HCMV, se pueden alternar las vacunas de H-UL128C y gB/pp65 para inhibir la vía de infección de Epi/EC. Hay 3 vacunas de MVA que pueden ser evaluadas: 1) MVA único: H-UL128C-gB-pp65-MVA [7 Ag], 2) dos MVA independientes (H-UL128C-MVA [5 Ag] + gB/pp65-MVA [2 Ag]) introducidos en una mezcla y 3) gH/gL/gO-MVA, que es una modificación simple de

gH/gL de HCMV que se puede construir (no se muestran datos). Los resultados *in vitro* son importantes para los estudios en ratón y en MR.

Tabla 4

	Cepas de MVA de vacuna	TB40/E y TR	Interpretación
Células ARPE-19	UL128C + gB/pp65	Infección nula	Interferencia nula de gB/pp65
Células ARPE-19	UL128C + gB/pp65	Infección	Interferencia de gB/pp65
Células ARPE-19	UL128C	Infección nula	Ensamblaje correcto de H-UL128C
Células ARPE-19	UL128C	Infección	Ensamblaje incorrecto de H-UL128C
Fibroblastos	UL128C + gB/pp65	Infección	Esperado (Vanarsdall et al, 2011)
Fibroblastos	UL128C	Infección	Esperado (Vanarsdall et al, 2011)
Fibroblastos	gB/pp65	Infección	Esperado (Vanarsdall et al, 2011)
Fibroblastos	gH/gL/gO	Inhibición parcial	Esperado (Vanarsdall et al, 2011)

5

5 *Inmunización con la vacuna combinada de UL128C + gB/pp65 en ratones BALB/c.* Para determinar la capacidad de generar AcN para ambas vías de entrada de la infección por HCMV, la de endocitos y la de fibroblastos, se pueden investigar cinco combinaciones diferentes de vacunas con UL128C y gB/pp65 de acuerdo con la tabla 5 a continuación. Los detalles específicos de los procedimientos de inmunización serán los mismos que los descritos anteriormente. Deben obtenerse AcN que inhiban las vías de infección de HCMV de fibroblastos y endocitos mediante la inmunización de ratones con 1 o 2 MVA que incluyen las 7 subunidades (tabla 5). Tanto las ARPE-19 como los fibroblastos deben ser resistentes a la infección por los dos HCMV tanto Epi/EC-tropicos como fibroblastotrópicos después del desafío *in vitro* solo si H-UL128C-MVA y gB/pp65-MVA (grupos A o E) a la vez o una sola vacuna que exprese los 7 Ag (grupo D) generan AcN con éxito para inhibir sus respectivas vías de infección. La interferencia provocada por la inyección simultánea de los Ag en 1 o 2 MVA permitiría la infección de las células ARPE-19 (tabla 4). En ese caso, H-UL128C-MVA se puede inyectar independientemente de gB/pp65-MVA como se muestra en la tabla 5, seguido de una evaluación de los AcN que inhiben la infección por HCMV. Si las inyecciones independientes de cada virus de vacuna aún causan interferencia, también se pueden realizar estudios en MR para mejorar el poder predictivo.

20

Tabla 5

Tipo de MVA	Grupo	Ratón	Mono
UL128C + gB/pp65	A	Sí, N=10	Sí, N=6
UL128C	B	No	Sí, N=6
gB/pp65	C	Sí, N=10	Sí, N=6
UL128C-gB-pp65	O	Sí, N=10	D o E, N=6
UL128C, después gB/pp65	E	Sí, N=10	E o D, N=6
GFP-MVA	F	Sí, N=10	Sí, N=6
<b>Vacunas totales</b>	<b>Todos los grupos</b>	<b>N=50</b>	<b>N=30</b>

25 Se proponen estudios en ratones BALB/c utilizando un régimen de vacunas como el descrito anteriormente. La concentración de MVA, el tiempo entre las inmunizaciones y la extracción de suero pueden variar dependiendo de los niveles de neutralización observados.

30 Los estudios en MR que utilizan formulaciones de vacunas y niveles de dosis se pueden realizar según los estudios descritos anteriormente. Los niveles de dosis, el tiempo entre las inmunizaciones y el tiempo hasta las extracciones de sangre pueden alterarse para mejorar los resultados de neutralización *in vitro*. Si hay evidencia de interferencia, entonces pueden realizarse estudios de mezclas de MVA en MR para confirmar los estudios con ratones.

*Formulaciones de vacunas combinadas contra UL128C y gB/pp65 en MR negativos para RhCMV.* Los estudios en MR pueden comenzar después de obtener los resultados de estudios en ratones y extraer conclusiones. Si bien el

poder predictivo de los ratones puede ser limitado, permitirá reducir la cantidad de opciones para limitar la amplitud de los estudios en MR. Esto se puede lograr mediante la evaluación de estrategias utilizando 6 animales por grupo. Animales genéticamente modificados no infectados por RhCMV (N = 24; ~1-2 años) se asignarán aleatoriamente a uno de los 4 grupos en la 1ª etapa de la evaluación (tabla 5; grupos A-C, F). Los animales se analizarán repetidamente para confirmar que son negativos para RhCMV. A cada animal del CNPRC se le ha realizado un tipado molecular por mapeo de microsátélites para determinar el parentesco y el haplotipo del MHC de clase I (Mamu A\*01, B\*01 y B\*17). La distribución de los animales a cada grupo vacunado se basará en el equilibrado de la diversidad genética. Los hermanos o medio hermanos se separarán por grupos. El éxito con el enfoque de la mezcla (tabla 5, grupo A) impulsaría la investigación de un MVA que exprese los 7 antígenos que comprenden UL128C y gB/pp65 como una segunda etapa de evaluación (tabla 5, grupo D). Sin embargo, si la combinación de antígenos reduce la capacidad de la vacuna para generar AcN en suero o mucosa para inhibir las vías de infección de endocitos y de fibroblastos, este resultado puede sugerir interferencia. Una segunda etapa de vacunación alternativa puede ser UL128C-MVA y gB/pp65-MVA administrados alternativamente en un patrón de 6 semanas de manera que cada vacuna se administre dos veces para procurar que la posibilidad de interferencia sea menor, si ambas dosis de la misma vacuna se administran repetidamente en lugar de alternativamente (tabla 5, grupo E). El análisis de los resultados de la vacunación mediante la neutralización *in vitro* se llevará a cabo de manera similar a los estudios en ratones y MR descritos en los ejemplos 8 y anteriores. El objetivo de estos estudios es el descubrimiento de una vacuna contra HCMV que genere AcN para las vías de infección de HCMV de endocitos y fibroblastos que pueden constituir la base de un registro de la FDA para investigaciones en seres humanos.

En este ejemplo, todas las vacunas contienen pp65, una diana de las células T que se asoció con la protección contra la excreción (Abel et al. 2010). En consecuencia, los monocitos de sangre periférica de cada extracción de sangre pueden almacenarse y evaluarse utilizando citometría de flujo de citoquinas después de la estimulación *in vitro* utilizando pp65 superpuestas y bibliotecas de péptidos de control.

Además, pueden examinarse los títulos de AcN en suero y mucosa (saliva) utilizando un ensayo *in vitro* descrito en el ejemplo 8. Se puede elegir un régimen de vacunas y una formulación para la evaluación de la segunda etapa basada en los títulos séricos de AcN, ya que esas mediciones son más utilizadas. Sin embargo, se medirán AcN de mucosa y se dará preferencia a la vacuna que genere AcN tanto en suero como en mucosa mejor que a un candidato que solo genere AcN en suero.

El desafío con RhCMV en animales negativos para RhCMV después de la vacunación con RhCMV-MVA se puede realizar por diferentes vías. Si las vacunas contienen subunidades de RhCMV y se inyectan a macacos negativos para RhCMV, entonces se puede realizar un estudio de desafío formal utilizando cepas epiteliotrópicas virulentas de RhCMV. La vía de desafío puede ser mucosa (intranasal), subcutánea como en Wussow et al. 2013, o la cohabitación de macacos positivos para RhCMV con animales vacunados negativos para RhCMV.

## BIBLIOGRAFÍA

Abel, K., J. Martinez, Y. Yue, S. F. Lacey, Z. Wang, L. Strelow, A. Dasgupta, Z. Li, K. A. Schmidt, K. L. Oxford, B. Assaf, J. A. Longmate, D. J. Diamond, y P. A. Barry. 2011. Vaccine-induced control of viral shedding following rhesus cytomegalovirus challenge in rhesus macaques. *J.Virol.* 85:2878-2890.

Abel, K., L. Strelow, Y. Yue, M. K. Eberhardt, K. A. Schmidt, y P. A. Barry. 2008. A heterologous DNA prime/protein boost immunization strategy for rhesus cytomegalovirus. *Vaccine* 26:6013-6025.

Adler SP, Nigro G, Pereira L. Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol.* 2007;31:10-18.

Adler SP, Nigro G. Interrupting intrauterine transmission of cytomegalovirus. *Rev Med Virol.* 2006;16:69-71.

Adler, B., L. Scrivano, Z. Ruzcics, B. Rupp, C. Sinzger, y U. Koszinowski. 2006. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J.Gen.Virol.* 87:2451-2460.

Adler, S. P., S. E. Starr, S. A. Plotkin, S. H. Hempfling, J. Buis, M. L. Manning, y A. M. Best. 1995. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J.Infect.Dis.* 171:26-32.

Adler, S. P., S. H. Hempfling, S. E. Starr, S. A. Plotkin, y S. Riddell. 1998. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 17:200-206.

Arvin, A. M., P. Fast, M. Myers, S. Plotkin, y R. Rabinovich. 2004. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin.Infect.Dis.* 39:233-239.

- Assaf, B. T., K. G. Mansfield, S. V. Westmoreland, A. Kaur, K. L. Oxford, D. J. Diamond, y P. A. Barry. 2012. Patterns of Acute Rhesus Cytomegalovirus (RhCMV) Infection Predict Long-Term RhCMV Infection. *J.Virol.* 86:6354-6357.
- 5 Barry PA, Chang W-LW. Primate Betaherpesviruses. En: Arvin A, Campadielli G, Moore P, Mocarski ES, Roizman B, Whitley RJ et al., eds. *Human Herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University press; 2007:1051-1075.
- Barry PA, Strelow LI. 2012 Development of Breeding Populations of Rhesus Macaques That Are Specific Pathogen Free for Rhesus Cytomegalovirus. *Comparative Medicine.* 58:43-46..
- 10 Barry, P. A., K. M. Lockridge, S. Salamat, S. P. Tinling, Y. Yue, S. S. Zhou, S. M. Gospe, Jr., W. J. Britt, and A. F. Tarantal. 2006. Nonhuman primate models of intrauterine cytomegalovirus infection. *ILAR.J.* 47:49-64.
- 15 Bernstein, D. I., E. A. Reap, K. Katen, A. Watson, K. Smith, P. Norberg, R. A. Olmsted, A. Hoepfer, J. Morris, S. Negri, M. F. Maughan, y J. D. Chulay. 2009. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine* 28:484-493.
- Boppana SB, Britt WJ. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 1995;171:1115-1121.
- 20 Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 2001;344:1366-1371.
- 25 Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:417-470.
- Britt WJ, Vugler L, Stephens EB. Induction of complement-dependent and -independent neutralizing antibodies by recombinant-derived human cytomegalovirus gp55-116 (gB). *J Virol.* 1988;62:3309-3318.
- 30 Britt, W. J., L. Vugler, E. J. Butfiloski, y E. B. Stephens. 1990. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J.Virol.* 64:1079-1085.
- 35 Britt WJ. Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology.* 1984;135:369-378.
- Cha TA, Tom E, Kemble GW et al. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol.* 1996;70:78-83.
- 40 Cottingham MG, Gilbert SC. Rapid generation of markerless recombinant MVA vaccines by en passant recombineering of a self-excising bacterial artificial chromosome. *J Virol Methods.* 2010;168:233-236.
- Cottingham, M. G., R. F. Andersen, A. J. Spencer, S. Saurya, J. Furze, A. V. Hill, y S. C. Gilbert. 2008. Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA). *PLoS.One.* 3:e1638.
- 45 Cui, X., B. P. Meza, S. P. Adler, y M. A. McVoy. 2008. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine* 26:5760-5766.
- 50 Domi, A. y B. Moss. 2002. Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:12415-12420.
- Dunn W, Chou C, Li H et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:14223-14228.
- 55 Earl PL, Americo JL, Wyatt LS et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara provides durable protection against disease caused by an immunodeficiency virus as well as long-term immunity to an orthopoxvirus in a non-human primate. *Virology.* 2007;366:84-97.
- 60 Earl, P. L., B. Moss, L. S. Wyatt, y M. W. Carroll. 2001. Generation of recombinant vaccinia viruses. *Curr.Protoc.Mol.Biol.* Chapter 16:Unit16.
- Endresz, V., K. Burian, K. Berencsi, Z. Gyulai, L. Kari, H. Horton, D. Virok, C. Meric, S. A. Plotkin, y E. Gonczol. 2001. Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus. *Vaccine* 19:3972-3980.
- 65

- Fouts, A. E., P. Chan, J. P. Stephan, R. Vandlen, y B. Feierbach. 2012. Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 complex comprise the majority of the anti-CMV neutralizing antibody response in CMV-HIG. *J.Virol.* 86:7444-7447.
- 5 Genini, E., E. Percivalle, A. Sarasini, M. G. Revello, F. Baldanti, y G. Gerna. 2011. Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *J.ClinVirol.* 52:113-118.
- 10 Gerna, G., A. Sarasini, M. Patrone, E. Percivalle, L. Fiorina, G. Campanini, A. Gallina, F. Baldanti, y M. G. Revello. 2008. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J.Gen.Virol.* 89:853-865.
- Gonczol E, Ianacone J, Ho WZ et al. Isolated gA/gB glycoprotein complex of human cytomegalovirus envelope induces humoral and cellular immune-responses in human volunteers. *Vaccine.* 1990;8:130-136.
- 15 Gonczol E, Plotkin S. Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1:401-412.
- 20 Grazia RM, Baldanti F, Percivalle E et al. In vitro selection of human cytomegalovirus variants unable to transfer virus and virus products from infected cells to polymorphonuclear leukocytes and to grow in endothelial cells. *J Gen Virol.* 2001;82:1429-1438.
- 25 Griffiths, P. D., A. Stanton, E. McCarrell, C. Smith, M. Osman, M. Harber, A. Davenport, G. Jones, D. C. Wheeler, J. O'Beirne, D. Thorburn, D. Patch, C. E. Atkinson, S. Pichon, P. Sweny, M. Lanzman, E. Woodford, E. Rothwell, N. Old, R. Kinyanjui, T. Haque, S. Atabani, S. Luck, S. Prideaux, R. S. Milne, V. C. Emery, y A. K. Burroughs. 2011. Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 377:1256-1263.
- 30 Hahn, G., M. G. Revello, M. Patrone, E. Percivalle, G. Campanini, A. Sarasini, M. Wagner, A. Gallina, G. Milanese, U. Koszinowski, F. Baldanti, y G. Gerna. 2004. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J.Virol.* 78:10023-10033.
- 35 Hanke T, McMichael AJ, Dennis MJ et al. Biodistribution and persistence of an MVA-vectored candidate HIV vaccine in SIV-infected rhesus macaques and SCID mice. *Vaccine.* 2005;23:1507-1514.
- Hansen SG, Powers CJ, Richards R et al. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science.* 2010;328:102-106.
- 40 Hansen, S. G., L. I. Strelow, D. C. Franchi, D. G. Anders, y S. W. Wong. 2003. Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J.Virol.* 77:6620-6636.
- Heineman TC, Schleiss M, Bernstein DI et al. A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis.* 2006;193:1350-1360.
- 45 Huff, J. L., R. Eberle, J. Capitanio, S. S. Zhou, y P. A. Barry. 2003. Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques. *J.Gen.Virol.* 84:83-92.
- Isaacson, M. K. y T. Compton. 2009. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J.Virol.* 83:3891-3903.
- 50 Jarvis MA, Nelson JA. Molecular basis of persistence and latency. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
- 55 Johnson, D. C. y P. G. Spear. 1983. O-linked oligosaccharides are acquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus. *Cell* 32:987-997.
- Kharfan-Dabaja, M. A., M. Boeckh, M. B. Wilck, A. A. Langston, A. H. Chu, M. K. Wloch, D. F. Guterwill, L. R. Smith, A. P. Rolland, y R. T. Kenney. 2012. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect.Dis.* 12:290-299.
- 60 Kinzler ER, Compton T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol.* 2005;79:7827-7837.
- 65 La Torre R, Nigro G, Mazzocco M, Best AM, Adler SP. Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease. *Clin Infect Dis.* 2006;43:994-1000.

- Lanzavecchia et al. U.S. Patent Publication No. 2009/0081230
- Lilja, A. E. y T. Shenk. 2008. Efficient replication of rhesus cytomegalovirus variants in multiple rhesus and human cell types. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:19950-19955.
- 5 Lilleri D, Fornara C, Furione M et al. Development of Human Cytomegalovirus-Specific T Cell Immunity during Primary Infection of Pregnant Women and Its Correlation with Virus Transmission to the Fetus. *J Infect Dis.* 2007;195:1062-1070.
- 10 Liu YN, Klaus A, Kari B et al. The N-terminal 513 amino acids of the envelope glycoprotein gB of human cytomegalovirus stimulates both B- and T-cell immune responses in humans. *J Virol.* 1991;65:1644-1648.
- Lubaki MN, Egan MA, Siliciano RF, Weinhold KJ, Bollinger RC. A novel method for detection and ex vivo expansion of HIV type 1- specific cytolytic T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10:1427-1431.
- 15 Macagno, A., N. L. Bernasconi, F. Vanzetta, E. Dander, A. Sarasini, M. G. Revello, G. Gerna, F. Sallusto, y A. Lanzavecchia. 2010. 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.
- 20 Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathol.* 2006;168:1210-1226.
- Maidji E, Percivalle E, Gerna G, Fisher S, Pereira L. Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. *Virology.* 2002;304:53-69.
- 25 Mansat A, Mengelle C, Chalet M et al. Cytomegalovirus detection in cryopreserved semen samples collected for therapeutic donor insemination. *Hum Reprod.* 1997;12:1663-1666.
- 30 Manuel, E. R., Z. Wang, Z. Li, R. C. La, W. Zhou, y D. J. Diamond. 2010. Intergenic region 3 of modified vaccinia ankara is a functional site for insert gene expression and allows for potent antigen-specific immune responses. *Virology* 403:155-162.
- 35 Marshall, G. S., G. G. Stout, M. E. Knights, G. P. Rabalais, R. Ashley, H. Miller, y E. Rossier. 1994. Ontogeny of glycoprotein gB-specific antibody and neutralizing activity during natural cytomegalovirus infection. *J.Med.Virol.* 43:77-83.
- 40 Mayr, A. y K. Malicki. 1966. [Attenuation of virulent fowl pox virus in tissue culture and characteristics of the attenuated virus]. *Zentralbl.Veterinarmed.B* 13:1-13.
- Murphy, E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. A. Jarvis, G. Hahn, J. A. Nelson, R. M. Myers, y T. E. Shenk. 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:14976-14981.
- 45 Navarro D, Paz P, Tugizov S et al. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology.* 1993;197:143-158.
- 50 Nigro G, Torre RL, Pentimalli H et al. Regression of fetal cerebral abnormalities by primary cytomegalovirus infection following hyperimmunoglobulin therapy. *Prenat Diagn.* 2008;28:512-517.
- Nigro, G., S. P. Adler, T. R. La, y A. M. Best. 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N.Engl.J.Med.* 353:1350-1362.
- 55 Oxford, K. L., L. Strelow, Y. Yue, W. L. Chang, K. A. Schmidt, D. J. Diamond, y P. A. Barry. 2011. Open reading frames carried on UL/b' are implicated in shedding and horizontal transmission of rhesus cytomegalovirus in rhesus monkeys. *J.Virol.* 85:5105-5114.
- Oxford, K. L., M. K. Eberhardt, K. W. Yang, L. Strelow, S. Kelly, S. S. Zhou, y P. A. Barry. 2008. Protein coding content of the UL)b' region of wild-type rhesus cytomegalovirus. *Virology* 373:181-188.
- 60 Oxford, K. L., M. K. Eberhardt, K. W. Yang, L. Strelow, S. Kelly, S. S. Zhou, y P. A. Barry. 2008. Protein coding content of the UL)b' region of wild-type rhesus cytomegalovirus. *Virology* 373:181-188.
- 65 Pass, R. F., A. M. Duliege, S. Boppana, R. Sekulovich, S. Percell, W. Britt, y R. L. Burke. 1999. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J.Infect.Dis.* 180:970-975.

- Pass, R. F., C. Zhang, A. Evans, T. Simpson, W. Andrews, M. L. Huang, L. Corey, J. Hill, E. Davis, C. Flanigan, y G. Cloud. 2009. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N.Engl.J.Med.* 360:1191-1199.
- 5 Patrone M, Secchi M, Fiorina L et al. Human cytomegalovirus UL130 protein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. *J Virol.* 2005;79:8361-8373.
- Plachter B, Sinzger C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res.* 1996;46:195-261.
- 10 Plotkin SA, Furukawa T, Zygraich N, Huygelen C. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun.* 1975;12:521-527.
- Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM et al. Effect of Towne live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial [ver comentarios]. *Ann Intern Med.* 1991;114:525-531.
- 15 Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, Gonczol E, Weibel RE. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J Infect Dis.* 1989;159:860-865.
- Rasmussen, L., C. Matkin, R. Spaete, C. Pachi, y T. C. Merigan. 1991. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J.Infect.Dis.* 164:835-842.
- 20 Revello, M. G. and G. Gerna. 2010. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev.Med.Virol.* 20:136-155.
- Rivailler, P., A. Kaur, R. P. Johnson, y F. Wang. 2006. Genomic sequence of rhesus cytomegalovirus 180.92: insights into the coding potential of rhesus cytomegalovirus. *J.Virol.* 80:4179-4182.
- Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol.* 2006;80:710-722.
- 30 Ryckman, B. J., B. L. Rainish, M. C. Chase, J. A. Borton, J. A. Nelson, M. A. Jarvis, y D. C. Johnson. 2008b. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J.Virol.* 82:60-70.
- 35 Ryckman, B. J., M. C. Chase, y D. C. Johnson. 2008a. HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:14118-14123.
- Ryckman, B. J., M. C. Chase, y D. C. Johnson. 2010. Human cytomegalovirus TR strain glycoprotein O acts as a chaperone promoting gH/gL incorporation into virions but is not present in virions. *J.Virol.* 84:2597-2609.
- 40 Saccoccio F, Sauer A, Cui X et al. 2011. Peptides from cytomegalovirus UL130 and UL131 proteins induce high titer antibodies that block viral entry into mucosal epithelial cells. *Vaccine.* 29:2705-2711.
- 45 Saccoccio, F. M., A. L. Sauer, X. Cui, A. E. Armstrong, e. Habib, D. C. Johnson, B. J. Ryckman, A. J. Klingelutz, S. P. Adler, y M. A. McVoy. 2011. Peptides from cytomegalovirus UL130 and UL131 proteins induce high titer antibodies that block viral entry into mucosal epithelial cells. *Vaccine* 29:2705-2711.
- Schleiss MR. Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection: recent advances. *Curr Opin Pediatr.* 2006a;18:48-52.
- 50 Schleiss, M. R. 2006b. Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *ILAR.J.* 47:65-72.
- 55 Schleiss, M. R. 2010. Cytomegalovirus vaccines and methods of production (WO20009049138): the emerging recognition of the importance of virus neutralization at the epithelial/endothelial interface. *Expert.Opin.Ther.Pat* 20:597-602.
- Schleiss, M. R., A. McGregor, K. Y. Choi, S. V. Date, X. Cui, y M. A. McVoy. 2008. Analysis of the nucleotide sequence of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome. *Virol.J.* 5:139.
- 60 Sequar, G., W. J. Britt, F. D. Lakerman, K. M. Lockridge, R. P. Tarara, D. R. Canfield, S. S. Zhou, M. B. Gardner, y P. A. Barry. 2002. Experimental coinfection of rhesus macaques with rhesus cytomegalovirus and simian immunodeficiency virus: pathogenesis. *J.Virol.* 76:7661-7671.
- 65 Shenk et al. U.S. Patent Application Publication No. 2008/0187545.

- Shimamura, M., M. Mach, y W. J. Britt. 2006. Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M (gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *J.Virol.* 80:4591-4600.
- 5 Sinzger, C., M. Digel, y G. Jahn. 2008. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 325:63-83.
- Stagno S, Reynolds D, Tsiantos A et al. Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women: suppression in early gestation. *J Infect Dis.* 1975;131:522-527.
- 10 Stratton, K. R., J. S. Durch, y R. S. Lawrence. 2001. *Vaccines for the 21st Century: A tool for Decisionmaking.* Bethesda: National Academy Press.
- Timm A, Enzinger C, Felder E, Chaplin P. Genetic stability of recombinant MVA-BN. *Vaccine.* 2006;24:4618-4621.
- 15 Tischer, B. K., E. J. von, B. Kaufer, y N. Osterrieder. 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 40:191-197.
- Tischer, B. K., G. A. Smith, y N. Osterrieder. 2010. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol.Biol.* 634:421-430.
- 20 Urban, M., M. Klein, W. J. Britt, E. Hassfurther, y M. Mach. 1996. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J.Gen.Virol.* 77 (Pt 7):1537-1547.
- van Kooten, C. y J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. *J.Leukoc.Biol.* 67:2-17.
- 25 Vanarsdall, A. L. y D. C. Johnson. 2012. Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr.Opin.Virol.* 2:37-42.
- Vanarsdall, A. L., B. J. Ryckman, M. C. Chase, y D. C. Johnson. 2008. Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *J.Virol.* 82:11837-11850.
- 30 Wang D, Li F, Freed DC et al. Quantitative analysis of neutralizing antibody response to human cytomegalovirus in natural infection. *Vaccine.* 2011. 29:9075-9080.
- Wang Z, La Rosa C, Lacey SF et al. Attenuated poxvirus expressing three immunodominant CMV antigens as a vaccine strategy for CMV infection. *J Clin Virol.* 2006;35:324-331.
- 35 Wang Z, La Rosa C, Mekhoubad S et al. Attenuated Poxviruses Generate Clinically Relevant Frequencies of CMV-Specific T cells. *Blood.* 2004;104:847-856.
- Wang Z, Zhou W, Srivastava T et al. A fusion protein of HCMV IE1 exon4 and IE2 exon5 stimulates potent cellular immunity in an MVA vaccine vector. *Virology.* 2008;377:379-390.
- 40 Wang, D. y T. Shenk. 2005a. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J.Virol.* 79:10330-10338.
- 45 Wang, D. y T. Shenk. 2005b. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:18153-18158.
- Wang, Z., J. Martinez, W. Zhou, R. C. La, T. Srivastava, A. Dasgupta, R. Rawal, Z. Li, W. J. Britt, y D. Diamond. 2010. Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines. *Vaccine* 28:1547-1557.
- 50 Wang, Z., R. C. La, R. Maas, H. Ly, J. Brewer, S. Mekhoubad, P. Daftarian, J. Longmate, W. J. Britt, y D. J. Diamond. 2004. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J.Virol.* 78:3965-3976.
- 55 Wang, Z., R. C. La, Z. Li, H. Ly, A. Krishnan, J. Martinez, W. J. Britt, y D. J. Diamond. 2007. Vaccine properties of a novel marker gene-free recombinant modified vaccinia Ankara expressing immunodominant CMV antigens pp65 and IE1. *Vaccine* 25:1132-1141.
- 60 Wilck MB, Chu A, Wloch M et al. Interim Analysis of a Phase 2 Trial of TransVax™, a Therapeutic DNA Vaccine for Control of Cytomegalovirus in Transplant Recipients [abstract]. *ICAAC.* 2010.
- 65 Wille, P. T., A. J. Knoche, J. A. Nelson, M. A. Jarvis, y D. C. Johnson. 2010. A human cytomegalovirus gO-null mutant fails to incorporate gH/gL into the virion envelope and is unable to enter fibroblasts and epithelial and endothelial cells. *J.Virol.* 84:2585-2596.

- Wloch MK, Smith LR, Boutsaboualoy S et al. Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects. *J Infect Dis.* 2008;197:1634-1642.
- 5 Wussow F, Yue Y, Martinez J, Deere JD, Longmate J, Herrmann A, Barry PA, Diamond DJ. 2013. A vaccine based on the rhesus cytomegalovirus UL128 complex induces broadly neutralizing antibodies in rhesus macaques. *J Virol.* 2013 Feb;87(3):1322-32.
- 10 Wyatt, L. S., P. L. Earl, W. Xiao, J. L. Americo, C. A. Cotter, J. Vogt, y B. Moss. 2009. Elucidating and minimizing the loss by recombinant vaccinia virus of human immunodeficiency virus gene expression resulting from spontaneous mutations and positive selection. *J.Virol.* 83:7176-7184.
- 15 Yamada, S., N. Nozawa, H. Katano, Y. Fukui, M. Tsuda, Y. Tsutsui, I. Kurane, y N. Inoue. 2009. Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early genes, UL128, and UL130. *Virology* 391:99-106.
- 20 Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:12396-12401.
- Yue, Y. and P. A. Barry. 2008. Rhesus cytomegalovirus a nonhuman primate model for the study of human cytomegalovirus. *Adv.Virus Res.* 72:207-226.
- Yue, Y., S. S. Zhou, y P. A. Barry. 2003. Antibody responses to rhesus cytomegalovirus glycoprotein B in naturally infected rhesus macaques. *J.Gen.Virol.* 84:3371-3379.
- 25 Yue, Y., Z. Wang, K. Abel, J. Li, L. Strelow, A. Mandarino, M. K. Eberhardt, K. A. Schmidt, D. J. Diamond, y P. A. Barry. 2008. Evaluation of recombinant modified vaccinia Ankara virus-based rhesus cytomegalovirus vaccines in rhesus macaques. *Med.Microbiol.Immunol.* 197:117-123.
- 30 Zhang, C. y R. F. Pass. 2004. Detection of cytomegalovirus infection during clinical trials of glycoprotein B vaccine. *Vaccine* 23:507-510.
- Zhang, C., H. Buchanan, W. Andrews, A. Evans, y R. F. Pass. 2006. Detection of cytomegalovirus infection during a vaccine clinical trial in healthy young women: seroconversion and viral shedding. *J.Clin.Virol.* 35:338-342.

**REIVINDICACIONES**

- 5     **1.** Un sistema de expresión que comprende una construcción de cromosoma artificial bacteriano (BAC), comprendiendo la construcción de BAC un vector viral insertado con un conjunto de secuencias de ADN que codifican un complejo de UL128, en el que el vector viral es un vector vaccinia Ankara modificado (MVA) y en el que el complejo de UL128 comprende un conjunto de cinco proteínas de CMV, en el que el conjunto de cinco proteínas de CMV son UL128, UL130, UL131A, gL y gH.
- 10    **2.** Una composición de vacuna para prevenir la infección por CMV que comprende un vector viral que comprende un conjunto de secuencias de ADN que codifican un complejo de UL128; y un portador, adyuvante, aditivo o combinación de los mismos farmacéuticamente aceptable, en la que el vector viral es un vector vaccinia Ankara modificado (MVA) y en el que el complejo de UL128 comprende un conjunto de cinco proteínas de CMV, en el que el conjunto de cinco proteínas de CMV son UL128, UL130, UL131A, gL, y gH.
- 15    **3.** El sistema de expresión o la composición de vacuna de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el vector viral tiene insertadas además una o más secuencias de ADN adicionales que codifican una o más proteínas de CMV adicionales o fragmentos antigénicos de las mismas seleccionadas de pp65, gB o ambas.
- 20    **4.** Una cantidad efectiva de un vector viral que comprende un conjunto de secuencias de ADN que codifican un complejo de UL128, para su uso en la prevención de la entrada de CMV en una célula, en el que el vector viral comprende un vector vaccinia Ankara modificado (MVA) y en el que el complejo de UL128 comprende un conjunto de cinco proteínas de CMV, en el que el conjunto de cinco proteínas de CMV son UL128, UL130, UL131A, gL y gH.
- 25    **5.** El vector viral para uso de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además una o más secuencias de ADN que codifican proteínas de CMV adicionales o fragmentos antigénicos de las mismas seleccionadas de pp65, gB, o ambas, o de gM/gN y gO.
- 30    **6.** Vector viral para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la célula es una célula epitelial, una célula endotelial o un fibroblasto.
- 7.** Una vacuna contra CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para uso en el tratamiento de una infección por CMV.
- 35    **8.** La vacuna de CMV para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la infección por CMV es una infección congénita por CMV.

FIG. 1

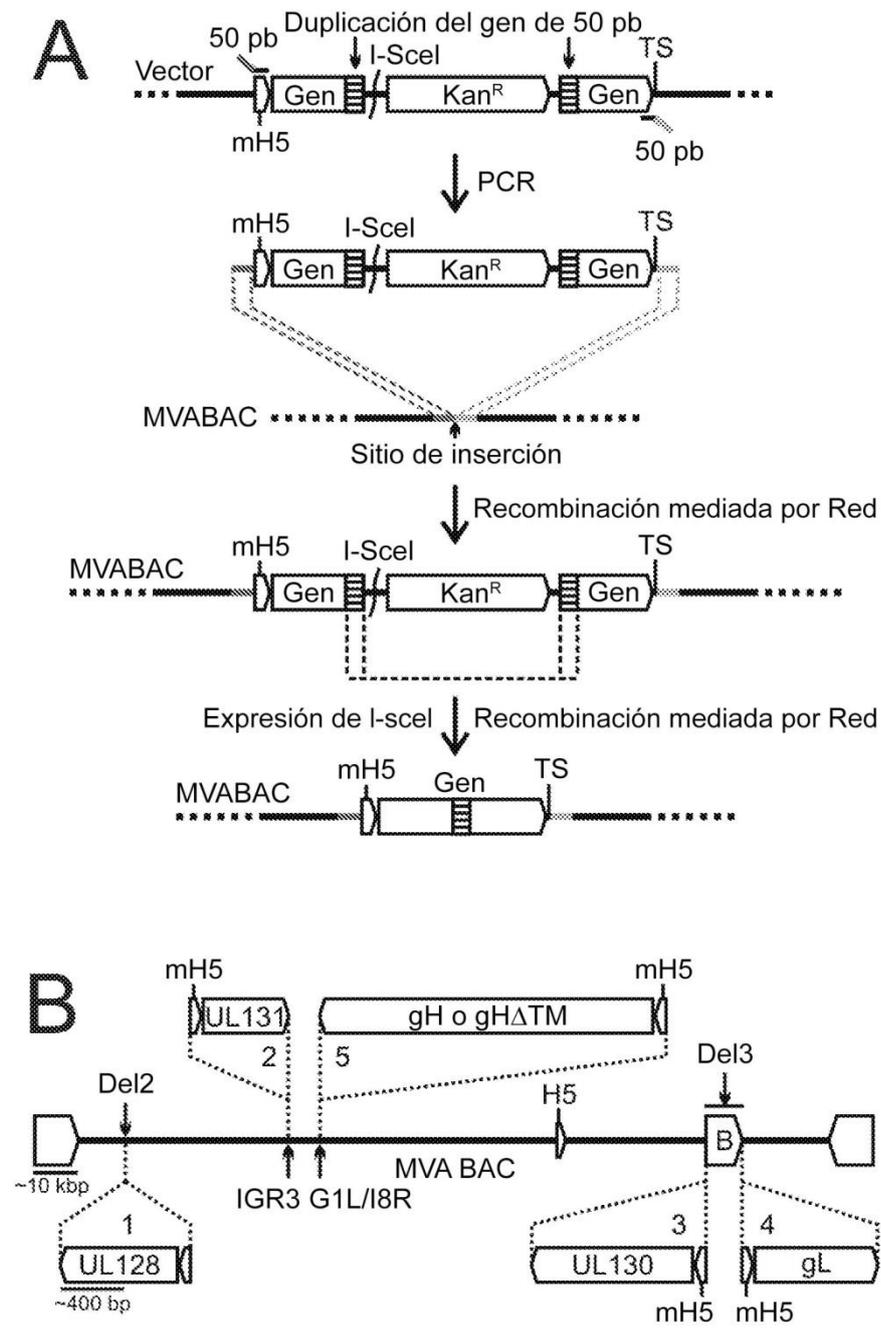


FIG. 2

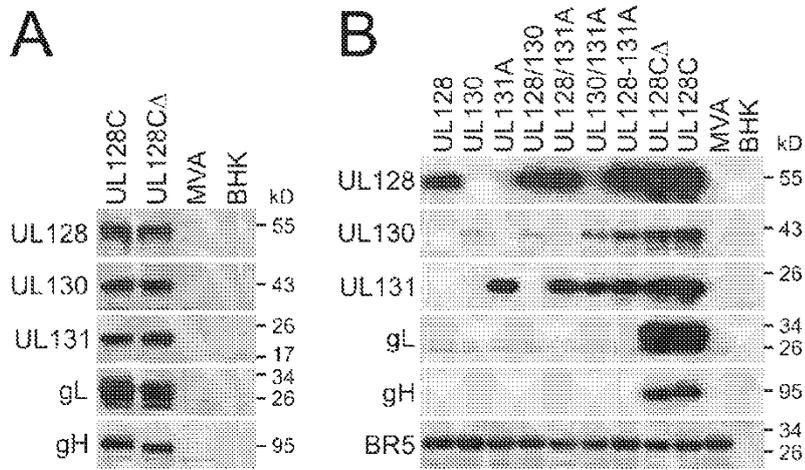


FIG. 3

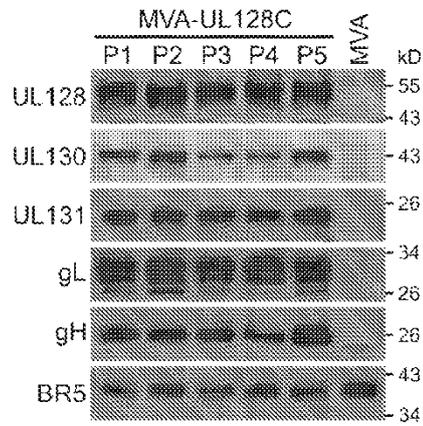


FIG. 4

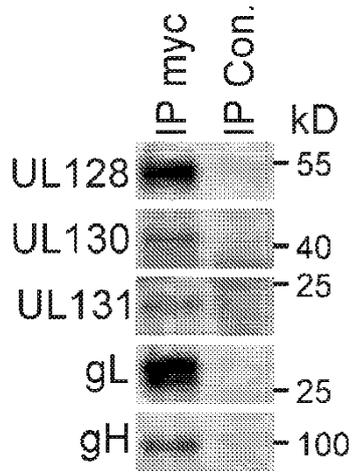


FIG. 5

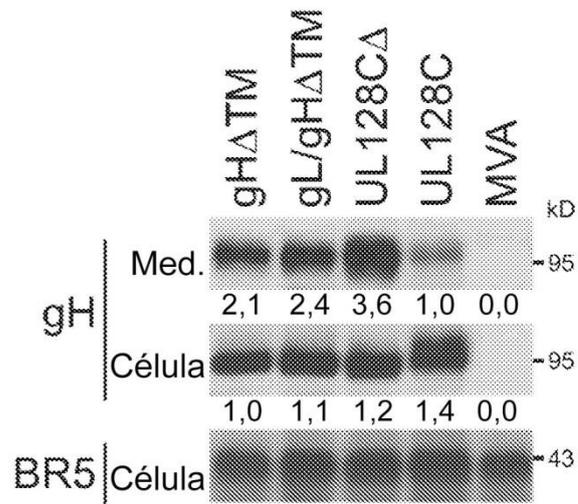




FIG. 8

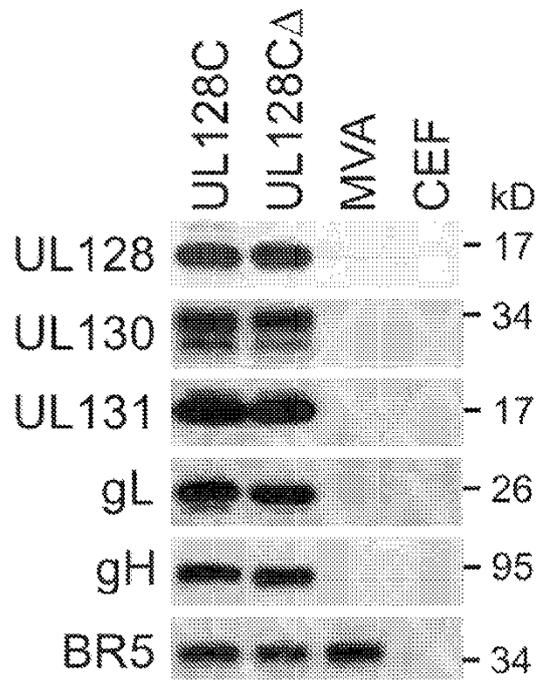


FIG. 9

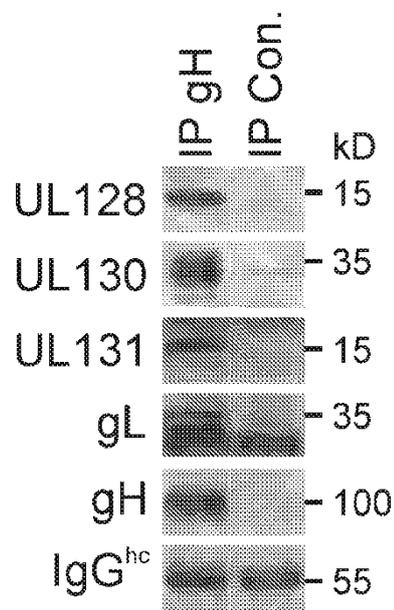


FIG. 10

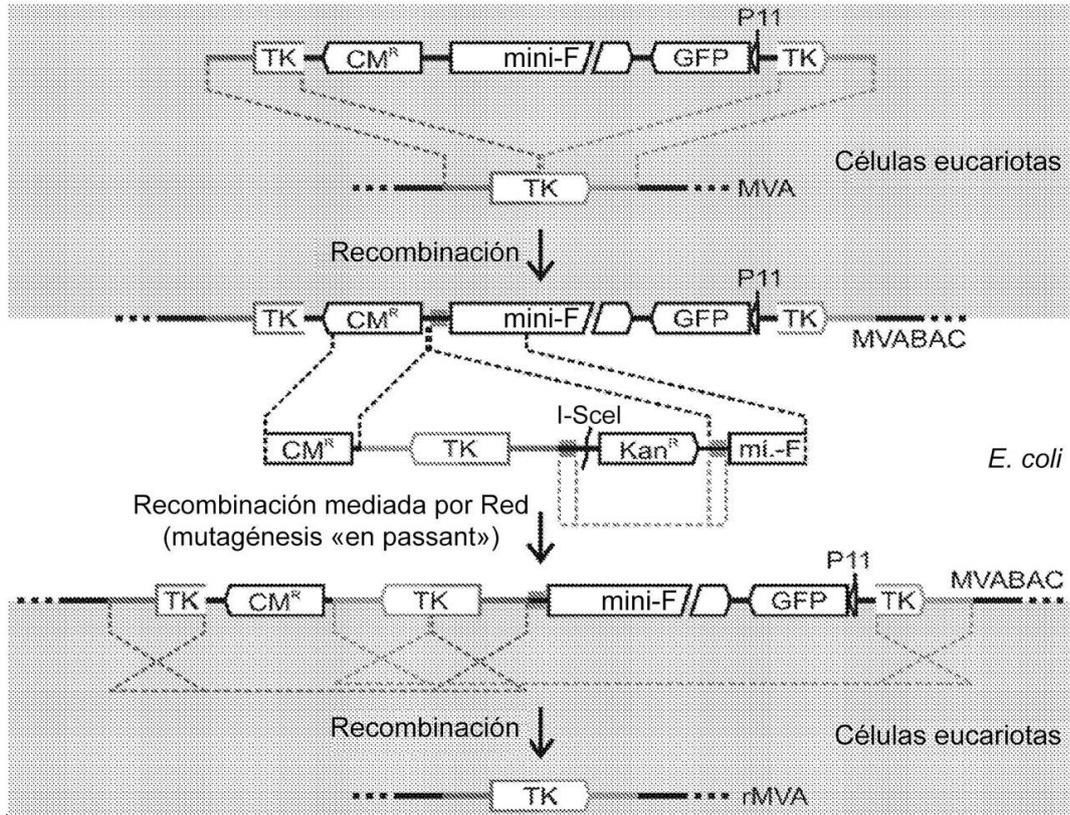


FIG. 11

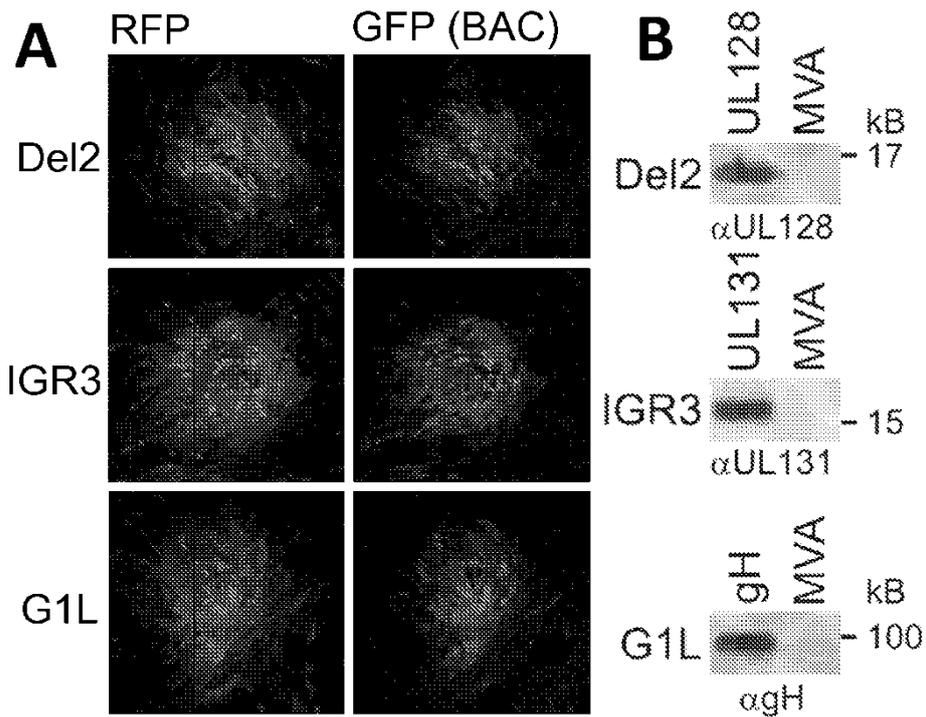


FIG. 12

