(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 746 960**

(51) Int. CI.:

A61K 39/145 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2007 PCT/US2007/078314**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08085557**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007 E 07872297 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2066346**

(54) Título: **Partículas de replicón de alfavirus que codifican IL-12 como adyuvantes inmunológicos**

(30) Prioridad:

12.09.2006 US 825394 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2020

(73) Titular/es:

ALPHAVAX, INC. (100.0%)
2 Triangle Drive
Research Triangle Park, NC 27709-0307, US

(72) Inventor/es:

SMITH, JONATHAN F.;
HUBBY, BOLYN;
BERGLUND, PETER;
COPP, LAURA y
ELLIS, WHITNEY

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Partículas de replicón de alfavirus que codifican IL-12 como adyuvantes inmunológicos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos 60/825,394, presentada el 12 de septiembre de 2006.

Declaración sobre la investigación o desarrollo patrocinado por el gobierno federal

No aplicable

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a la tecnología de ADN recombinante, y en particular a la introducción de ácido(s) nucleico(s) exógeno(s) en una célula eucariota, y más particularmente a métodos para producir composiciones inmunogénicas que comprenden partículas de virus infecciosos o partículas similares a virus con altos rendimientos, especialmente partículas que expresan interleucina-12 útiles en inmunoterapias, vacunas y / o aplicaciones de terapia génica. En particular, la presente descripción proporciona preparaciones de partículas de replicón de alfavirus (ARP) que expresan interleucina 12 (IL-12), para su uso en medicina humana y veterinaria y para mejorar la respuesta del sistema inmune a un antígeno administrado simultáneamente.

El género Alphavirus incluye una variedad de virus, todos los cuales son miembros de la familia Togaviridae. Los alfavirus incluyen el virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus Everglades, virus Mucambo, virus Pixuna, virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus Middleburg, virus Chikungunya, virus O'nyongnyong, virus Ross River, virus Barmah Forest, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus Mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Babanki, virus Kyzylagach, virus Highlands J, virus Fort Morgan, virus Ndumu, y virus Buggy Creek. El genoma viral es un ARN monocatenario directo mensajero, modificado en el extremo 5' con una caperuza metilada y en el extremo 3' con un tramo de poli (A) de longitud variable. Las subunidades estructurales que contienen una sola proteína viral, cápside, se asocian con el genoma de ARN en una nucleocápside icosaédrica. En el virión, la cápside está rodeada por una envoltura lipídica cubierta con una matriz regular de picos de proteínas transmembrana, cada uno de los cuales consiste en un complejo heterodimérico de dos glucoproteínas, E1 y E2. Véase Pedersen et al., J. Virol 14:40 (1974). Los virus Sindbis y Semliki Forest se consideran los alfavirus prototípicos y se han estudiado ampliamente. Véase Schlesinger, The Togaviridae and Flaviviridae, Plenum Publishing Corp., Nueva York (1986). El virus EEV se ha estudiado ampliamente, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.185.440.

Los estudios de estos virus han llevado al desarrollo de técnicas para la vacunación contra las enfermedades por alfavirus y contra otras enfermedades mediante el uso de vectores de alfavirus para la introducción de genes exógenos. Véase la patente de EE.UU. nº 5.185.440 de Davis et al., y la publicación PCT WO 92/10578. El uso de vectores de alfavirus para dirigir la expresión de genes exógenos en eucariotas se ha convertido en un tema de creciente interés. Es bien sabido que las vacunas virales vivas atenuadas están entre los medios más eficaces para controlar la enfermedad viral. Sin embargo, para algunos patógenos virales, la inmunización con una cepa de virus vivo puede ser poco práctica o insegura. Una estrategia alternativa es la inserción de secuencias que codifican antígenos inmunizantes de dichos agentes en una cepa viva y replicante de otro virus. Uno de tales sistemas que utiliza un vector EEV vivo se describe en las patentes de EE.UU. nºs 5.505.947 y 5.643.576 de Johnston et al. Otro sistema de este tipo lo describe Hahn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2679-2683 (1992), en el que las construcciones del virus Sindbis expresan una forma truncada de la proteína hemaglutinina de la gripe. Otro sistema es el sistema de replicón de alfavirus, como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.190.666 de Garoff et al., patentes de EE.UU. nºs 5.792.462 y 6.156.558 de Johnston et al., patentes de EE.UU. nºs 5.814.482, 5.843.723, 5.789.245, 6.015.694, 6.105.686 y 6.376.236 de Dubensky et al; solicitud publicada de EE.UU. nº 2002-0015945 A1 (Polo et al.), solicitud publicada de EE.UU. nº 2001-0016199 (Johnston et al.), Frolov et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11371-11377 y Pushko et al. (1997) Virology 239: 389-401. Las construcciones mejoradas, tanto auxiliares como de replicón, para su uso en la producción de partículas de replicón de alfavirus se describen en la patente de EE.UU. nº 7.045.335 (Smith et al.) y en el documento WO 2004/085660 (Smith et al.), y se describen nuevos procesos para su fabricación en la patente de EE.UU. nº 7.078.218 (Smith et al.).

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos que permitan la producción de una respuesta inmune más efectiva hacia una composición inmunogénica administrada, especialmente composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos proteicos, incluidos los expresados a partir de partículas de replicón de alfavirus, especialmente uno que comprende menos antígeno que en una composición de vacuna convencional, especialmente cuando se busca una respuesta inmune protectora, de modo que haya una enfermedad menos grave, un riesgo reducido de enfermedad o ausencia de enfermedad en respuesta al patógeno relevante. El documento WO 2006085983 proporciona adyuvantes virales para mejorar una respuesta inmune a un inmunógeno. En realizaciones particulares, el adyuvante viral es un adyuvante de alfavirus o un adyuvante viral de encefalitis equina venezolana. El documento WO 2006085983 también proporciona métodos para producir una respuesta inmune contra un inmunógeno en un sujeto, que comprende administrar el inmunógeno y un adyuvante viral de la invención al sujeto.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para su uso en un método para potenciar una respuesta inmune a un antígeno administrado a un sujeto, y el uso comprende administrar al sujeto, al mismo tiempo y en la misma localización, el antígeno y las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12, en donde las partículas de replicón de alfavirus derivan de partículas de replicón de virus de encefalitis equina venezolana (EEV), por ejemplo, en donde el antígeno y las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 se administran ventajosamente al sujeto al mismo tiempo y en la misma localización que el inmunógeno de interés.

También se proporcionan en la presente memoria partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para su uso en métodos para reducir el riesgo de contraer o para reducir la gravedad de una enfermedad en un sujeto, y el uso comprende administrar, al mismo tiempo y en la misma localización, (a) un antígeno seleccionado del microorganismo o virus que causa la enfermedad y (b) partículas de replicón de alfavirus que expresan interleucina-12 (IL-12). El inmunógeno (usado de manera intercambiable con el antígeno en la presente memoria) puede ser una proteína, glicoproteína, lipoproteína, el producto de expresión de un minigen cuyo producto comprende una cadena lineal de epítopos de interés (por ejemplo, de una hemaglutinina del virus de la gripe o de otro virus), una toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, virus atenuado, virus inactivado, células bacterianas o parte(s) de estas, bacterias inactivadas, bacterias atenuadas, células fúngicas o parte(s) de estas, hongo atenuado, hongo inactivado, parásito o parte(s) del mismo, parásito inactivado, parásito atenuado, protozoo o parte(s) del mismo, protozoo inactivado o partes del mismo, protozoo atenuado, ADN o ARN capaz de expresar un antígeno o fragmentos o epítopos del mismo, inmunógeno vectorizado con virus de viruela, inmunógeno vectorizado con alfavirus o vectorizado con adenovirus, así como polisacárido, lipopolisacárido o lipooligosacárido.

Además se proporciona una composición de vacuna, que comprende (a) una preparación de antígeno seleccionada del grupo que consiste en una proteína, glicoproteína, lipoproteína, toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, virus atenuado, virus inactivado, células bacterianas o porción(es) de las mismas, bacterias inactivadas, bacterias atenuadas, células fúngicas o porción(es) de las mismas, hongos atenuados, hongos inactivados, parásitos o porción(es) de los mismos, parásitos inactivados, parásitos atenuados, protozoos o porción(es) de los mismos, protozoos inactivados o porciones de los mismos, protozoos atenuados, ADN capaz de expresar un antígeno o fragmentos o epítopos del mismo, inmunógeno vectorizado con virus de viruela, inmunógeno vectorizado con alfavirus o vectorizado con adenovirus, antígeno o tejido de células tumorales o una porción del mismo, así como polisacárido, lipopolisacárido o lipooligosacárido; y (b) partículas de replicón de alfavirus que expresan interleucina-12, en donde las partículas de replicón de alfavirus son partículas de replicón del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV).

En las composiciones y usos descritos en la presente memoria, el alfavirus del que derivan las partículas de replicón de alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), deseablemente un virus EEV atenuado. El virus EEV u otras partículas de replicón de alfavirus derivado de alfavirus pueden diseñarse para la producción de IL-12 y / o un inmunógeno de interés. Cuando hay ARPs que expresan IL-12 administradas junto con una preparación de ARP que expresa un inmunógeno, la dosis de VRP que expresa un inmunógeno es más preferiblemente igual o mayor que la dosis de partículas de replicón de EEV que expresan IL-12.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra que las IL12-VRP administradas conjuntamente con múltiples proteínas mejoran las respuestas inmunes celulares. Las respuestas celulares a $HA_{Wyoming}$, $HA_{New\ Caledonia}$ y gD de HSV se presentan en la Figura 1A, 1B y 1C, respectivamente. Los ratones Balb/c se inmunizaron con cualquiera de las proteínas recombinantes mencionadas o con las tres combinadas, como sigue: (a) VRP de IL-12 + 100 ng de proteína recombinante; (b) 100 ng de mezcla de proteínas recombinantes (las tres proteínas combinadas); (c) VRP de IL-12 + 100 ng mezcla de proteínas recombinantes)

La Figura 2 ilustra que VRP de IL-12 mejora las respuestas celulares a los antígenos expresados por VRP. Respuestas celulares en ratones inmunizados con una dosis constante (5×10^5 unidades infecciosas, UI) de CEA VRP solo o en combinación con dosis crecientes de VRP "vacío" (sin gen exógeno insertado), VRP que expresa un inmunógeno irrelevante (HA), o IL12 VRP, como se indica. Las dosis utilizadas varían de 5×10^1 a 5×10^7, como se indica. Los experimentos de titulación mostraron que la mejora óptima de las respuestas celulares a una dosis de 5×10^5 unidades infecciosas (UI) de VRP de CEA se logró al usar 5×10^5 UI de VRP de IL-12.

La Figura 3 proporciona una comparación entre los efectos adyuvantes de la IL-12 soluble y la VRP de IL-12 desde el punto de vista de las respuestas celulares específicas de CEA a VRP de CEA. Se inmunizaron grupos de 8 ratones Balb/c por vía subcutánea en la semana 0 y la semana 3 con 5×10^5 UI de VRP de CEA en combinación con VRP de IL-12 o IL-12 recombinante soluble (1-100 ng). Los grupos de control recibieron VRP de CEA en combinación con VRP vacío o con 100 ng de proteína irrelevante (HA), como se indica. Se obtuvieron muestras de suero y bazos una semana después del refuerzo para el análisis de las respuestas celulares.

Las Figs. 4A-4C demuestran que la VRP de IL-12 mejora las respuestas humorales y celulares a una inmunización a baja dosis de proteína HA. Los ratones se inmunizaron con 100 ng de $HA_{Wyoming}$ recombinante, solos, en combinación con VRP vacío a 5×10^5 UI por dosis o con VRP de IL-12 a 5×10^5 UI por dosis. Las respuestas humorales se midieron

en sueros obtenidos un día antes del refuerzo (Fig. 5A) o una semana después del refuerzo (Fig. 5B). Las respuestas celulares (Fig. 5C) se midieron mediante ELISpot utilizando una biblioteca de péptidos superpuestos que abarcaban toda la secuencia de aminoácidos de HA.

La Figura 5 muestra la actividad reductora de la dosis del adyuvante de VRP de IL-12 para vacunas HA recombinantes. Los grupos (a) - (d) (de 6 ratones Balb/c cada uno) se inmunizaron en la almohadilla de la pata en la semana 0 y 3 con dosis crecientes de $HA_{Wyoming}$ expresada en baculovirus ("HA rec") obtenido de Protein Sciences, Inc.: (a) 1 ng de HA rec; (b) 10 ng de HA rec; (c) 100 ng de HA rec; (d) 1000 ng de HA rec. Los grupos (e) - (h) recibieron las mismas dosis crecientes de HA rec pero mezcladas con 5 x 10^5 UI de VRP de IL-12: (e) 1 ng de HA rec + 5 x 10^5 UI de VRP de IL-12; (f) 10 ng de HA rec + 5 x 10^5 UI de VRP de IL-12; (g) 100 ng de HA rec + 5 x 10^5 UI de VRP de IL-12; (h) 1000 ng de HA rec + 5 x 10^5 UI de VRP de IL-12. Las muestras de suero se analizaron para determinar la IgG específica de HA mediante ELISA con muestras tomadas justo antes del refuerzo (barras claras) y una semana post-refuerzo (barras sombreadas). Las placas de Elisa se revistieron con la misma proteína recombinante que se usó para el inmunógeno. Para analizar las respuestas celulares, se recogieron los bazos 1 semana post-refuerzo y se evaluaron los linfocitos esplénicos para detectar las células T específicas de HA utilizando ensayos ELISPOT de interferón gamma y un conjunto de péptidos derivados de HA superpuestos. Se determinó el número de células SFC / 1 e6 y se representó gráficamente (barras negras sólidas, eje Y secundario). El grupo de control (i) recibió 5 x 10^5 UI de VRP vacío + 100 ng de HA rec.

La Figura 6 ilustra el requerimiento de dosis para la actividad adyuvante de VRP de IL-12. Los ratones se inmunizaron con 100 ng de proteína HA recombinante complementada con VRP de IL-12 a dosis diez veces mayores, que van desde 5 x 10^3 a 5 x 10^7 UI: (a) 100 ng de HA recombinante; (b) 100 ng de HA recombinante + 5 x 10^3 UI de VRP de IL-12; (c) 100 ng de HA recombinante + 5 x 10^4 UI de VRP de IL-12; (d) 100 ng de HA recombinante + 5 x 10^3 UI de VRP de IL-12; (e) 100 ng de HA recombinante + 5 x 10^6 UI de VRP de IL-12; (f) 100 ng de HA recombinante + 5 x 10^7 UI de VRP de IL-12. Se midieron las respuestas inmunes humorales y mediadas por células, véase la leyenda de la Figura 6 para los detalles experimentales. Un grupo de ratones se inmunizó con 5 x 10^5 UI de VRP de IL-12 en la almohadilla de la pata izquierda, mientras que la proteína HA recombinante se administró mediante una inyección con una aguja distinta en la almohadilla de la pata derecha (g).

La Figura 7 ilustra el perfil del isotipo IgG después de la inmunización subcutánea de ratones con proteína HA en combinación con adyuvantes VRP. (a) 100 ng de proteína HA recombinante; (b) 100 ng de proteína HA recombinante + 5 x 10^5 VRP "vacía"; (c) 100 ng de proteína HA recombinante + 5 x 10^5 VRP de IL-12.

La Figura 8 muestra los títulos de anticuerpos específicos del antígeno después de la sensibilización (barra izquierda en pareja) y el refuerzo (barra derecha en pareja) con un cóctel de antígenos proteicos (HA New Caledonia , HA Wyoming , gD de HSV) con o sin ARPs que expresan IL-12.

Las Figuras 9A-9B muestran la expresión de IL-12 murina a partir de un vector replicón de EEV. Figura 9 (A): un solo ORF que codifica una construcción de proteína de fusión de las dos subunidades de IL-12, p35 y p40, se clonó en el vector de alfavacuna en posición posterior del promotor 26S. Figura 9 (B): los lisados que contienen 2 µg de proteína total de células Vero infectadas con VRP de IL-12 e incubadas durante 16 horas se procesaron para SDS-PAGE y transferencia de Western usando un antisuero específico de IL-12. Los carriles 2-6 representan IL-12 recombinante en cantidades que varían en 40-400 ng, como se indica. La migración de los marcadores de tamaño molecular de 51 o 28 kDa se indica en la figura.

La Figura 10 muestra que las respuestas humorales a las propias VRPs ("anticuerpo neutralizante anti-VRP") no aumentan con las ARPs de IL-12. Los ratones se inmunizaron con VRP de CEA o CEA en combinación con VRP de IL-12: (a) 5 x 10^5 VRP de CEA; (b) 5 x 10^6 VRP de CEA; (c) 5 x 10^7 VRP de CEA; (d) 5 x 10^5 VRP de CEA + 5 x 10^5 VRP de IL-12; (e) 5 x 10^6 VRP de CEA + 5 x 10^6 VRP de IL-12; (f) 5 x 10^7 VRP de CEA + 5 x 10^7 VRP de IL-12. Las respuestas humorales a CEA se midieron con ELISA (barras oscuras), mientras que las respuestas a VRP se determinaron como títulos neutralizantes (barras claras).

La Figura 11 muestra que el VRP de IL-12 coadministrado con TIV aumenta significativamente las respuestas inmunes humorales al componente de gripe A / HA New Caledonia (H1) de la TIV. Se inmunizaron grupos de seis ratones Balb/c dos veces, con TIV en dosis que variaron en incrementos de 10 veces de 1 ng a 1000 ng, que se administraron solas (barras blancas) o se coadministraron (barras negras) con VRP de IL-12 a dosis que variaron de 1 x 10^4 a 1 x 10^6 UI, como se indica. Un grupo recibió 100 ng de TIV combinado con 1 x 10^6 UI de VRP vacía, como se indica. Una semana después del refuerzo, se obtuvieron sueros de los animales y se analizaron con respecto a los títulos de ELISA de anticuerpos específicos para HA New Caledonia. La barra de la derecha representa las respuestas humorales en ratones sensibilizados con 100 ng de TIV combinados con 1 x 10^6 UI de VRP de IL-12 pero reforzados con 100 ng de TIV solo.

La Figura 12 muestra respuestas humorales al componente A / HA Wyoming (H3) de la TIV en las muestras de suero recogidas de los ratones como se describe en la Figura 11.

La Figura 13 muestra las respuestas de células T a A / HA Wyoming H3 medida mediante ELISPOT a los 7 días después de la inmunización en ratones inmunizados una vez con el mismo inóculo como se describe en las Figuras

11 y 12, anteriormente.

La Figura 14 muestra las respuestas de células T a A / NA Wyoming (neuraminidasa) medidas mediante ELISPOT a los 7 días después de la inmunización en ratones inmunizados una vez con el mismo inóculo como se describe en las figuras 11 y 12, anteriormente.

Descripción detallada de la invención

Existe la necesidad en la técnica de adyuvantes de vacunas rentables, potentes y que reduzcan la dosis, especialmente con respecto a las vacunas contra el cáncer, las toxinas y la gripe, así como vacunas para otras enfermedades. En la presente memoria se proporciona un sistema de vector replicón de ARN, derivado de un alfavirus atenuado, para producir adyuvantes de partículas de replicón de alfavirus (ARP) similares a virus deficientes de propagación, de ciclo único, que contienen un ARN (replicón) autorreplicable que expresa la citocina interleucina-12 (IL-12). Cuando se inoculan en animales, estos adyuvantes de ARP mejoran significativamente las respuestas inmunes humorales y celulares a los materiales inmunogénicos, tales como vacunas basadas en subunidades, proteínas, antígenos expresados por ARP u otros antígenos de interés. Es particularmente importante generar una respuesta rápida y fuerte a un patógeno, por ejemplo, un virus de la gripe pandémica o estacional.

Los experimentos mostraron que los ARP basados en EEV, también denominados en la presente memoria "VRPs", que expresan la Interleucina 12 murina (mIL-12) funcionaron como un adyuvante inmunológico muy potente cuando se administraron conjuntamente con VRPs que expresaban antígenos (por ejemplo, CEA, un antígeno asociado a tumores de células de cáncer de colon y HIV-gag) y proteína HA de virus de la gripe tipo A de los serotipos H3 y H1, así como con otros antígenos proteicos. La cantidad óptima requerida de ARP de IL-12, la elección óptima de las citocinas inmunoestimulantes y / o los antígenos de la gripe que se incluirán en los adyuvantes de ARP se pueden determinar fácilmente. Las vacunas inactivadas, atenuadas o basadas en subunidades pueden combinarse con ARPs que expresan IL-12 para provocar respuestas inmunitarias funcionales y protectoras contra los virus de la gripe estacional (H1 y / o H3) y potencialmente pandémica (H5), así como cualquier otro patógeno de interés. También se pueden generar respuestas inmunes fuertes usando este mismo enfoque de antígeno y ARPs que expresan IL-12 para otros antígenos, además de los de patógenos.

Alternativamente, la proteína o polipéptido inmunogénico (antígeno) puede ser cualquier antígeno de células tumorales o cancerosas que sea una proteína (o polipéptido). El antígeno tumoral o canceroso puede ser uno expresado en la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos cancerosos ejemplares para cánceres de mama específicos son los antígenos HER2 y BRCA1. Otros antígenos ilustrativos de células cancerosas y tumorales se describen en S.A. Rosenberg, (1999) Immunity 10: 281) e incluyen, entre otros, los antígenos MART-1 / MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β-catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, p15 y p53, antígeno de tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno prostático de células madre (PSCA), aspartil (asparaginil) β-hidroxilasa humana (HAAH) y EphA2 (una tirosina quinasa de células epiteliales, véase la publicación de patente internacional nº WO 01/12172).

En los usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, la proteína inmunogénica también puede ser al menos una proteína inmunogénica del virus de la gripe, por ejemplo, una proteína hemaglutinina u otra proteína a la que un ser humano produce una respuesta inmunitaria protectora después de la administración de una composición inmunogénica que comprende la misma. Para las composiciones inmunogénicas derivadas de la gripe, son útiles aquellas que comprenden más de un tipo antigénico, tales como las preparaciones de vacuna antigripal inactivadas trivalentes o cócteles mixtos de proteína(s) producida(s) de forma recombinante. Otras proteínas inmunogénicas pueden obtenerse de otros patógenos virales, como el sarampión, paperas, rubéola, virus vacuna, herpesvirus, entre otros. Para la profilaxis de enfermedades bacterianas o intoxicaciones, la proteína inmunogénica puede ser toxinas y antígenos (atenuados) de carbunco de *Bacillus anthracis,* antígenos de *Yersinia pestis,* toxina de difteria inactiva de *Corynebacterium diphtheriae,* toxina inactiva de *Clostridium botulinum*, especies de *Chlamydia, Mycobacterium tuberculosis,* y otras conocidas en la técnica. Se pueden incorporar en los presentes usos y composiciones una proteína, glicoproteína, lipoproteína, toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, antígenos de células cancerosas, proteínas bacterianas o parte(s) de las mismas, toxinas inactivadas u otras proteínas bacterianas, proteínas fúngicas o parte(s) de las mismas, hongo atenuado, hongo inactivado, parásitos o proteínas o parte(s) de las mismas, proteínas de protozoos o parte(s) de las mismas, y el producto de expresión de un minigen que codifica una serie de epítopos de interés, por ejemplo de diferentes serotipos de virus de la gripe. Además, los antígenos de células neoplásicas pueden incorporarse en las estrategias de vacuna de reducción de la dosis para inmunizaciones terapéuticas o profilácticas. Alternativamente, la proteína o polipéptido inmunogénico puede ser cualquier antígeno tumoral o de células cancerosas. El antígeno tumoral o canceroso puede ser uno expresado en la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos cancerosos ejemplares para cánceres de mama específicos son los antígenos HER2 y BRCA1. Otros antígenos ilustrativos de células cancerosas y tumorales se describen en S.A. Rosenberg, (1999) Immunity 10: 281) e incluyen, entre otros, los antígenos MART-1 / MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β-catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, p15 y p53, antígeno de tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno prostático de células madre (PSCA), aspartil (asparaginil) β-hidroxilasa humana (HAAH) y EphA2 (una tirosina quinasa de células epiteliales, véase la publicación

de patente internacional nº WO 01/12172). La proteína inmunogénica puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento inmunogénico o epítopo de la misma.

Las ARPs adyuvantes se ensayan en un modelo de primates no humanos. Además de la optimización, estos estudios incluyen la monitorización de la toxicidad y la caracterización de los efectos reductores de la dosis debido a los adyuvantes de ARP. Para este propósito, se pueden usar vacunas contra la gripe existentes, como la vacuna trivalente contra la gripe (TIV) o una vacuna inactivada H5 Indonesia, y se miden las respuestas inmunes funcionales a las cepas de la gripe A. La versión humana y simia de la citocina seleccionada se clona y se empaqueta en VRP para su uso en el sujeto análogo usando los métodos proporcionados en la presente memoria. Aunque las citocinas humanas generalmente muestran bioactividad en primates no humanos, es deseable que las citocinas sean de la misma especie (p. ej., humanas, macacos Rhesus de origen chino), ya que la composición inmunogénica se administra para minimizar el riesgo de romper la tolerancia contra la citocina propiamente dicha.

Un aspecto de los usos y composiciones proporcionados en la presente memoria es la sorprendente capacidad de las ARPs que expresan IL-12 de mejorar la magnitud de las respuestas humorales o de anticuerpos hacia un antígeno administrado conjuntamente, sin embargo, independientemente de cómo se administre ese antígeno. Esta magnitud puede ser de 2 veces a más de 100 veces; es típica una mejora de 5 y 10 veces. Tal mejora es sorprendente, dada la naturaleza transitoria de la expresión y el funcionamiento localizado de las ARPs, y es útil para mejorar la efectividad de la vacuna y proporcionar altos niveles de anticuerpos para la recolección para su uso en aplicaciones de investigación, diagnóstico y terapéuticas.

Un aspecto adicional de los usos y composiciones proporcionados en la presente memoria es la capacidad de las ARPs que expresan IL-12 de reducir la dosis inmunogénica efectiva de antígeno requerida en un sujeto. Esta capacidad puede denominarse "reductora de la dosis", ya que permite que se use una cantidad dada de antígeno en más pacientes, reduciendo así el suministro de antígeno. Se han observado dosis reducidas en las que la dosis inmunogénica efectiva es de entre 2 veces y 1000 veces, por ejemplo, 3 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, con varios antígenos en combinación con partículas de replicón de EEV que expresan IL-12.

La capacidad de las ARPs que expresan IL-12 de reducir la dosis inmunogénica efectiva requerida también puede proporcionar una "reducción del refuerzo", ya que puede dar como resultado menos administraciones necesarias para proporcionar una inmunización efectiva de un sujeto contra el antígeno. Por ejemplo, es común administrar una dosis inicial de una vacuna y seguirla con una o dos dosis adicionales (es decir, de "refuerzo") a lo largo del tiempo, por ejemplo, después de 1 y 6 meses tras la dosis inicial, es decir, de "sensibilización". El uso de ARPs que expresan IL-12 permitirá una reducción en las inoculaciones requeridas, por ejemplo, en lugar de dos dosis de refuerzo, solo se requiere una o quizás ninguna dosis de refuerzo para alcanzar la dosis efectiva.

Como se describe en la presente memoria, las dosis altas de ARPs que expresan IL-12 (en comparación con el antígeno administrado) o la administración de ARPs antes de administrar un antígeno pueden dar como resultado una supresión de la respuesta inmune lograda hacia ciertos antígenos. Esto puede reflejar la supresión inmune que se ha observado previamente con un plásmido de ADN que expresa IL-12 coadministrado con una vacuna de ADN (Chen et al. 2001. J. Immunol. 166: 7419 y Gherardi et al. 2000. J. Virol. 74: 6278-86), aunque este efecto no lo observó Schadeck et al. La capacidad de administrar una única dosis de IL-12 de manera transitoria mediante el uso de ARPs puede proporcionar un enfoque superior y único y eficaz para tratar o prevenir aquellos trastornos en los que las respuestas inmunes inadecuadamente fuertes causan enfermedades, por ejemplo, trastornos autoinmunes, alergias, complicaciones durante el trasplante, como la enfermedad del injerto contra el huésped, y otras patologías del sistema inmunitario, como la explosión / tormenta de citoquinas, la hipersensibilidad de tipo retardado, la patología inmunitaria causada por una infección viral aguda y el choque anafiláctico.

Otro descubrimiento sorprendente es que la ARP que expresa IL-12 reduce el nivel de anticuerpos contra ARP generado en el sujeto, incluso al mismo tiempo que mejora las respuestas de anticuerpos a los antígenos expresados en el ARP. Por lo tanto, la supresión de anticuerpos contra un vector viral es otro aspecto de las presentes composiciones y usos. Tales anticuerpos neutralizantes anti-vectores contra adenovirus y otros tipos de vectores derivados de virus son una limitación seria de las estrategias de vacunación actualizadas en vectores, ya que el vector no puede usarse en un sujeto más de una vez sin un efecto significativamente disminuido. Aunque los vectores de VRP parecen ser inherentemente resistentes a las respuestas inmunitarias anti-vector, el uso de ARPs que expresan IL-12 podría reducir las respuestas anti-vector hacia ARP y otros vectores.

En ciertas realizaciones, los usos actuales se practican como parte de una estrategia de inmunización por sensibilización-refuerzo heteróloga, en la que la inmunización por "sensibilización", que comprende la administración inicial de uno o más antígenos a un animal, especialmente un paciente humano, en una forma (o "modalidad") en preparación para la(s) administración(es) posterior(es) (a menudo denominada(s) "refuerzo") del mismo antígeno en una forma o modalidad diferente. Específicamente, el término "sensibilizante", o alternativamente "iniciador" o "activante" de una respuesta inmune o "potenciador", define una primera inmunización que administra un antígeno que induce una respuesta inmune al antígeno deseado y provoca un nivel más alto de respuesta inmune hacia el antígeno deseado tras la reinmunización posterior con el mismo antígeno cuando se administra en el contexto de un sistema (es decir, forma o modalidad) de administración de vacuna diferente. Las formas de antígeno a administrar pueden comprender vectores de alfavirus, inmunógenos derivados de un patógeno o tumor, inmunógenos

recombinantes, péptidos sintéticos, organismos vivos, atenuados o inactivados o extractos de los mismos, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos formulados con restos que contienen lípidos, vectores de viruela, vectores adenovirales, vectores de herpesvirus, vectores de flavivirus, vectores de virus de estomatitis vesicular, vectores paramixovirales, vectores de parvovirus, vectores de papovavirus y vectores retrovirales. Los vectores virales pueden ser partículas similares a virus o ácidos nucleicos. En los usos descritos en la presente memoria, la etapa de sensibilización es la administración de una composición que comprende, además de un antígeno como se describió anteriormente, el ARP que expresa IL12 como adyuvante del antígeno. Después de la inmunización por sensibilización, se administra una "inmunización de refuerzo", o un "refuerzo", que es una composición que administra el mismo antígeno codificado en la inmunización por sensibilización. El refuerzo a veces se denomina respuesta anamnésica, es decir, una respuesta inmune en un animal previamente sensibilizado. Se pueden administrar múltiples refuerzos, utilizando cantidades diferentes o iguales para cada refuerzo. Al aplicar los usos de la presente memoria a una estrategia de sensibilización-refuerzo heteróloga, las inmunizaciones de "refuerzo" utilizan una composición que no contiene el VRP que expresa IL-12. Esta inmunización de "refuerzo" puede denominarse "refuerzo heterólogo", ya que es diferente (en su modalidad) de la inmunización por sensibilización.

La gripe se propaga rápidamente por todo el mundo en epidemias estacionales, lo que puede causar la muerte de millones de personas en años pandémicos y cientos de miles en años no pandémicos. Crea costos de atención médica con 200.000 hospitalizaciones en los EE.UU., y costos adicionales asociados con la pérdida de productividad. El siglo XX vio tres pandemias de gripe, cada una después de un cambio antigénico en el gen de la hemaglutinina (HA), que mató a millones de personas (no limitadas a ancianos) en todo el mundo. La principal amenaza mundial de pandemia de gripe es el H5, para el cual no existe inmunidad actual en la población.

La vacunación sigue siendo el método más eficiente y rentable para proteger al público contra la gripe. Aunque se están explorando nuevos enfoques, se siguen utilizando vacunas producidas con el virus de la gripe inactivado cultivado en huevos tradicional. Sin embargo, existen serias deficiencias en la tecnología, incluida la dependencia de los huevos, la inmunogenicidad impredecible y, por lo tanto, los requisitos de dosis, el riesgo de producir vacunas contra el tipo incorrecto de virus de la gripe y los riesgos de cantidades insuficientes de dosis de vacunas para proteger al público, lo que requiere una alta prioridad para funcionarios de atención médica.

Ilustrando la necesidad de mejoras, entre el 5 y el 20% de los estadounidenses contraen gripe cada año, causando un promedio de 36.000 muertes durante la década de 1990, a pesar de los esfuerzos anuales de vacunación. Según el CDCP, 218,1 millones de personas en los EE.UU. se incluirán en los grupos objetivo recomendados para la vacunación, incluidos 91,2 millones con un estado de alto riesgo. La cobertura de gripe autoinformada monitorizada mediante la Encuesta Nacional de Entrevistas de Salud de EE.UU. (NHIS) muestra un pequeño aumento en los últimos 10 años, y ha sido tan baja como un 24% y 46% para personas con un estado de alto riesgo en los grupos de edad 18-49 y 50-65, respectivamente, y solo el 40% entre los trabajadores de la salud. Una cobertura de vacuna más alta requeriría la fabricación de un número de dosis varias veces mayor que la capacidad actual. Esta situación es aún más apremiante para una posible gripe pandémica, donde la proyección es que se requerirá una dosis más fuerte, dado que se administran a personas sin exposición inmunológica previa, que normalmente no es el caso para las vacunas contra la gripe estacional.

El objetivo de lograr una protección de toda la población contra la gripe estacional y pandémica se beneficiaría significativamente de una tecnología que pudiera reducir la cantidad de antígeno por dosis, y / o si las vacunas actuales pudieran elevarse para inducir una respuesta inmune más amplia. Si bien las respuestas celulares (CTL) pueden tener un uso limitado para la protección contra la infección per se, la bibliografía sugiere que las respuestas CTL pueden tener un papel importante en la protección contra la mortalidad por gripe.

Se ha demostrado que el nuevo adyuvante proporcionado en la presente memoria es altamente reductor de la dosis en estudios preclínicos. Se descubrió que el adyuvante, VRPs que expresan IL-12, aumenta las respuestas contra la proteína HA en un grado que reduce la dosis de antígeno requerida para obtener títulos altos de anticuerpos en varios órdenes (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más veces) de magnitud. Además de mejorar la respuesta inmune humoral, la inclusión del adyuvante en el inóculo de vacuna en el modelo de ratón dio como resultado respuestas celulares significativas, que normalmente no se observan con vacunas de virus inactivados o de proteínas de subunidades.

Los ARPs que expresan IL-12 sirven como adyuvantes para otros ARPs que expresan inmunógenos útiles. Con el fin de determinar si los ARPs podrían diseñarse para expresar factores funcionales de potenciación inmunológica, varios genes diferentes que codificaban citocinas y otras proteínas inmunoestimuladoras se clonaron individualmente en el plásmido de ADN de replicón, y los ARNs transcritos se empaquetaron en VRP (es decir, "VRP adyuvante"). Los procedimientos utilizados en la presente memoria para preparar un VRP que expresa IL-12, que se basan en un sistema de dos auxiliares, se describen con detalle en la patente de EE.UU. nº 7.078.218. Específicamente, los ARNs de replicones protegidos se transcribieron *in vitro* utilizando un kit RiboMax T7 (Promega, Madison WI) siguiendo las instrucciones del fabricante, complementado con análogo CAP 7,5 mM (Promega), de pERK-IL-12 (replicón) linealizado con NotI, auxiliar de cápside, y plásmidos auxiliares de gp. Los ARN se purificaron usando columnas de purificación RNEasy (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células Vero (1 x 10^8 células) suspendidas en PBS se combinaron con 30 µg de replicón, 30 mg de auxiliar de cápside y 60 µg de ARN auxiliar de glucoproteína en cubetas de electroporación de 0,4 cm, y se sometieron a electroporación usando un aparato BIO-RAD Gene Pulser (BIO-RAD). Las células y el ARN se pulsaron cuatro veces con el electroporador

ajustado a 580 V y 25 µF. Se sembraron suspensiones de células electroporadas en botellas de rodillos individuales que contenían 150 ml de medio OptiPro (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con antibióticos y se incubaron a 37 °C en un 5% de CO_2 durante 16-24 h. Los VRP se recogieron y se almacenaron en alícuotas a -80 °C. Los títulos de VRP se determinaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) utilizando antisuero policlonal específico anti-EEV nsP2 de cabra como anticuerpo primario y anti-cabra Alexa Fluor 488 de burro (Invitrogen) como anticuerpo secundario en las células fijadas en metanol usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE300. Los ratones se inmunizaron con cócteles que contenían VRPs adyuvantes y VRPs que expresaban diversos antígenos. Los ratones se monitorizaron con respecto a las respuestas humorales al antígeno, y las respuestas celulares se midieron en los bazos obtenidos mediante necropsia realizada al final de los estudios. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Sorprendentemente, los VRPs que expresaban IL-12 fueron particularmente potentes para mejorar no solo las respuestas celulares, sino también las humorales al antígeno expresado por las VRPs.

Tabla 1. Co-administración de VRPs que expresan un inmunógeno con VRPs que expresan citocinas

Factor inmunoestimulador expresado por VRP	Ag expresado por VRP	Respuesta humoral mejorada	Respuesta de células T mejorada
IL-2	gag de HIV		-
IL-4	CEA	-	-
IL-4	gag de HIV	-	-
IL-12	CEA	++	++
IL-12	HA de gripe	++	++
IL-12	gag de HIV	++	++
IL-15	gag de HIV	+	-
IL-4 + IL-12	gag de HIV	-	++
MIP-1α	gag de HIV	-	-
MIP-1 β	gag de HIV	-	-

Se evaluaron más de 15 factores inmunomoduladores con respecto a su capacidad de mejorar las respuestas celulares y / o humorales a los antígenos expresados por VRP. La co-administración de VRP de IL-12 dio como resultado respuestas elevadas de células B y T a muchos antígenos expresados diferentes, que incluyen gag de HIV, HA de gripe (lo que incluye Wyoming, New Caledonia, Panama, Vietnam), CEA, HSV gD y Her2; véanse, por ejemplo, la Tabla 2 y la Tabla 3

Tabla 2. Efecto de VRP de IL-12 sobre el título de anticuerpos recíprocos

VRP que expresa antígeno	VRP de IL-12	Títulos recíprocos individuales	Media
CEA	nada	20480, 20480, 20480, 20480, 20480, 10240, 10240, 5120, 5120, 2560	14482
CEA	5 x 10^5	>81920*, >81920*, 81920, 40960, 20480, 20480, 20480, 20480, 10240, 5120	40960
HA	nada	40960, 40960, 20480, 20480, 20480, 20480, 20480, 10240, 5120, 2560	22334
HA	5 x 10^5	81920, 81920, 81920 81920, 81920, 40960, 40960, 40960, 20480, 5120	63169
* Para los valores > 81920, se usó el valor del siguiente valor de dilución doble (163840) para el cálculo de GMT			

Tabla 3. Efecto de VRP de IL-12 sobre el título de anticuerpos recíprocos

VRP que expresa CEA	VRP que expresa IL-12	Título recíproco (GMT)
5×10^4	Nada	4305
5×10^5	Nada	6241
5×10^6	Nada	17222
5×10^7	Nada	34443
5×10^4	5×10^4	11167
5×10^5	5×10^5	14482
5×16^6	5×10^6	31584
5×10^7	5×10^7	54386

Se realizaron experimentos para comparar los efectos adyuvantes de la VRP de IL-12 con los de IL-12 soluble. Los ratones se inmunizaron dos veces a intervalos de tres semanas con 5×10^5 UI de VRPs que expresaban CEA coadministradas con $5x\ 10^5$ UI de VRP de IL-12, VRP vacías, o con la proteína soluble IL-12 a 1 ng, 10 ng, o 100 ng por dosis. Las respuestas inmunológicas se midieron mediante ELISA específico de CEA (respuestas humorales) una semana después de la segunda inmunización (es decir, "post-refuerzo") y mediante ELISPOT (respuestas mediadas por células). La VRP de IL-12 fue significativamente más potente para elevar las respuestas mediadas por células al CEA que la IL-12 recombinante soluble en cualquiera de las dosis ensayadas. Aunque no se estudió el mecanismo de la naturaleza superior de la VRP de IL-12, y sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que el tropismo de las VRPs hacia los ganglios linfáticos produce la expresión de IL-12 directamente en un sitio donde se sabe que ocurre la presentación de un antígeno para la inducción de las respuestas de células T.

Actividad adyuvante de VRP que expresa Interleucina 12 para inmunógenos basados en proteínas

La actividad potenciadora del sistema inmune de VRP que expresa IL-12 ("VRP de IL-12") también puede emplearse en combinación con vacunas que no son ARP, por ejemplo, vacunas proteicas. Los ratones se inmunizaron dos veces por vía subcutánea con una dosis baja de proteína $HA_{Wyoming}$ sola o en combinación con VRP de IL-12. A las tres semanas después de la primera inmunización (es decir, "post-sensibilización"), las respuestas humorales hacia HA fueron significativamente mayores en los sueros del grupo que recibió proteína combinada con VRP de IL-12 que en los ratones inmunizados con proteína sola. Incluso dos inmunizaciones con proteína sola dieron como resultado títulos de ELISA recíprocos que fueron significativamente más bajos que los títulos obtenidos después de una sola inmunización usando VRP que expresaba IL-12. En marcado contraste, la VRP vacía, es decir, la VRP en la que el replicón no expresa ninguna secuencia heteróloga, elevó ligeramente las respuestas humorales anti-HA, pero solo a un nivel significativamente más bajo que la VRP que expresaba IL-12. Anteriormente se demostró que el efecto adyuvante de VRP vacía se basa en la señalización a través de IFN α / β, mientras que se sabe que IL-12 estimula las células del ganglio linfático para que secreten IFN-γ. Esto indica que expresar IL-12 en el mismo sitio que el antígeno tiene efectos inmunoestimulantes adicionales.

Las VRPs adyuvantes que expresan IL-12 dan como resultado respuestas inmunes mejoradas de células T

Se analizó el efecto de VRP de IL-12 sobre la inducción de respuestas de células T a antígenos proteicos coadministrados. Los ratones inmunizados dos veces con (a) proteína sola o (b) proteína mezclada con VRP de IL-12 se sacrificaron una semana después de la segunda inmunización (es decir, "post-refuerzo"). De forma similar a las respuestas humorales, hubo un efecto adyuvante significativo logrado al incluir el componente de VRP de IL-12 en la vacuna. Las proteínas son normalmente extremadamente pobres como inmunógenos de células T. HA no es una excepción, ya que no se detectaron SFCs en el ensayo ELISpot. Sin embargo, al incluir 5×10^5 UI de VRP de IL-12, se detectaron fuertes respuestas celulares específicas del antígeno. La diferencia fue dramática (1 frente a 462 SFCs por millón de linfocitos) (Fig. 4C), transformando así esencialmente una proteína recombinante soluble en una potente vacuna inductora de células T. Hasta donde se sabe, este es el adyuvante más potente conocido para provocar respuestas de células T contra la proteína inoculada en solución.

VRP de IL-12 como adyuvante reductor de la dosis y reductor del refuerzo

Además de ser un adyuvante útil para el aumento de la inmunidad y la inducción de células T, los experimentos han demostrado la utilidad de VRP de IL-12 para reducir la dosis en la vacunación contra la gripe basada en proteínas. Se inmunizaron grupos de ratones Balb/c con $HA_{Wyoming}$ recombinante a dosis que variaban de 1 ng a 1 µg. Los grupos se dividieron adicionalmente en dos, de manera que la mitad de los animales también recibieron 5×10^5 UI de adyuvante de VRP de IL-12. La proteína sola provocó títulos medios de ELISA de anticuerpos que varían de 30 a aproximadamente 500 a las tres semanas después de la primera inoculación, o "sensibilización", mientras que una

inmunización de refuerzo aumentó los títulos hasta aproximadamente 3100 GMT con las dosis más altas de proteína. Sin embargo, la inclusión de VRP de IL-12 en las vacunas mejoró significativamente los títulos de anticuerpos específicos de HA. Para todas las dosis ensayadas, una inmunización de proteína combinada con VRP de IL-12 dio como resultado respuestas humorales más fuertes que dos inmunizaciones con proteína sola. Esto indica que el adyuvante de VRP de IL-12 tuvo un efecto "reductor del refuerzo" sobre la vacuna de proteína. Al comparar los títulos de ELISA entre los grupos que recibieron dosis crecientes, fue evidente que se podían obtener respuestas humorales similares o más altas usando al menos 100 a 1000 veces menos antígeno proteico cuando se usaba en combinación con el adyuvante de VRP de IL-12, lo que indica un efecto significativo de reducción de la dosis. De hecho, una única inmunización con 10 ng de proteína combinada con VRP de IL-12 dio como resultado títulos de ELISA medios de aproximadamente 3600, significativamente más altos que los ratones inmunizados dos veces con 1000 ng de proteína sola, lo que indica un papel del adyuvante de reducción de la dosis y de reducción del refuerzo.

Las dosis óptimas de VRPs que expresaban IL-12 se determinaron inmunizando ratones con una dosis baja fija (por ejemplo, 100 ng) de proteína $HA_{Wyoming}$ recombinante. Las vacunas proteicas se formularon junto con VRP de IL-12 a diferentes dosis que variaron de 5e3 a 5e7 UI. Las respuestas humorales y celulares se midieron como para el experimento descrito anteriormente. Incluso la dosis más pequeña de VRP de IL12 proporcionó una actividad adyuvante detectable: la valoración de anticuerpos mostró que al incluir 5e4 UI de VRP de IL-12, las respuestas humorales aumentaron en aproximadamente un orden de magnitud. Curiosamente, la actividad adyuvante para las respuestas humorales alcanzó su punto máximo en 5e5 UI de VRP de IL-12, ya que 5e6 UI no tuvo un rendimiento más fuerte que 5e5 UI, y la administración conjunta de 5e7 UI de VRP de IL-12 dio como resultado respuestas humorales que fueron significativamente más bajas que usando 5e5 UI. Este experimento indica que se deben realizar estudios de aumento de la dosis para determinar las dosis óptimas del adyuvante para cada especie huésped, y posiblemente para cada vacuna proteica. Las respuestas inmunes celulares aumentaron en un comportamiento dosis-respuesta más típico. La inclusión de 5e4 UI de VRP de IL-12 aumentó el número de células formadoras de puntos de 2,5 a 55,3 por 1e6 linfocitos. Incrementar gradualmente la dosis de adyuvante en incrementos de diez veces aumentó el número de SFCs correspondientemente sin un pico o meseta obvio.

Uso de ARP de IL-12 como adyuvante universal para vacunas proteicas multivalentes

Muchas vacunas se formulan como preparaciones multivalentes, y se puede usar ARP que expresa IL12 como adyuvante en estas preparaciones. Se usaron cuatro proteínas recombinantes diferentes ($HA_{Wyoming}$, $HA_{New\ Caledonia}$, CEA y gD de HSV) solas o en un cóctel tetravalente para inmunizar ratones Balb/c. Los grupos se dividieron adicionalmente en ratones que recibieron VRP de IL-12 o diluyente solo como adyuvante. El ELISA se utilizó para medir las respuestas humorales hacia tres de los componentes con el fin de evaluar posibles efectos de inhibición cruzada o de saturación entre los antígenos proteicos. Como se esperaba, los títulos de anticuerpos contra $HA_{Wyoming}$ fueron significativamente mayores en los sueros de los ratones que también habían recibido VRP de IL-12 que en los ratones que recibieron $HA_{Wyoming}$ únicamente.

Los ratones se inmunizaron una o dos veces con una mezcla tetravalente (gD, HA New Cal, CEA y HA Wyoming) o con la misma mezcla que también incluía VRP de IL-12 (véanse la Figura 9 y la Tabla 4). Los datos muestran que VRP de IL-12 sirvió como adyuvante para las respuestas humorales hacia componentes proteicos específicos (HA New Cal, HA Wyo, gD) cuando se presentaron como parte de un cóctel. Por lo tanto, es posible usar VRP de IL-12 para mezclas complejas adyuvantes de inmunógenos, tales como lisados o preparaciones de virus inactivados. Es importante que las preparaciones antigénicas usadas en los usos y composiciones actuales se preparen correctamente para preservar las conformaciones nativas.

Tabla 4. Efecto de VRP de IL-12 sobre el título de anticuerpos recíprocos

Proteína Recombinante	VRP de IL-12 (IU)	Título recíproco medio (GMT)
HA Wyoming 100 ng	nada	285
HA Wyoming 100 ng	5×10^5	36.491
WyHA / NCHA / CEA / gD *	5×10^5	25.803
HA New Caledonia 100 ng	nada	80
HA New Caledonia 100 ng	5×10^5	12.902
WyHA / NCHA / CEA / gD *	5×10^5	2.032
gD de HSV 100 ng	nada	2874
gD de HSV 100 ng	5×10^5	11.494
WyHA / NCHA / CEA / gD *	5×10^5	8.127
* Se usó una mezcla de proteínas que consta de 100 ng de cada proteína		

Mecanismos de acción para adyuvantes basados en VRP

Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, los inventores creen que el aumento de las cantidades de IL-12 expresadas directamente en el sitio de presentación del antígeno sirve para elevar las respuestas de tipo T_H1. Se sabe que la interleucina 12 diferencia las células CD4 indiferenciadas en células similares a T_H1, que generalmente tienen el efecto de que la respuesta humoral impulse a las células plasmáticas a experimentar un cambio de isotipo de inmunoglobulina para la producción de IgG2a en ratones. Esto está en contraste con las respuestas de tipo TH2 que se correlacionan por un predominio de IgG1. Mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos para ambos isotipos, se pudo medir los títulos de ELISA recíprocos de IgG1 específica del antígeno, así como de IgG2a. Los ratones se inmunizaron con HA Wyoming recombinante intraperitonealmente o subcutáneamente solo o en combinación con VRP vacía o VRP de IL-12. Cuando se analizaron los sueros en función de sus perfiles de isotipo de IgG, no fue sorprendente ver que la proteína sola indujo predominantemente IgG1, lo que es coherente con una respuesta de tipo T_H2. La administración conjunta de VRP de IL-12 dio como resultado un aumento de las respuestas globales de anticuerpos, pero cambió el perfil a una respuesta predominantemente de IgG2a. El perfil de isotipo IgG cambió a un predominio de IgG2a cuando se administró SC una dosis baja de proteína, pero no cuando se administró IP una dosis grande. La VRP vacía utilizada como adyuvante elevó moderadamente las respuestas de IgG, pero no alteró el equilibrio de IgG1 / IgG2a. Esto es coherente con los hallazgos de Thompson et al, (2006) PNAS 103: 3722-3227 donde las respuestas mediadas por células no mejoraron drásticamente coadministrando VRP vacía. Por el contrario, el adyuvante de VRP de IL-12 dio como resultado respuestas de células T muy mejoradas.

El efecto de la VRP que expresa IL-12 puede ser más ventajoso durante la sensibilización, o la primera inmunización, cuando se usa un régimen de vacuna de dosis múltiple. Por lo tanto, se contempla que una composición de vacuna puede comprender: (1) una inyección de sensibilización inicial que contiene VRP de IL-12 y una preparación de antígeno, y (2) una o más inyecciones de refuerzo que contienen solo una preparación de antígeno (es decir, el mismo antígeno administrado en la misma preparación o en una preparación diferente, por ejemplo, proteína recombinante y VRP que expresa el antígeno). Por ejemplo, en las Figuras 11-14, cuando se usaron VRPs de IL-12 como adyuvantes para las respuestas a la vacuna contra la gripe actual, "TIV", la barra de la derecha en cada gráfico muestra la mejora significativa de las respuestas humorales y celulares después de la primera administración, o administración de sensibilización.

Anteriormente se descubrió que las vacunas de VRP dirigieron la expresión del gen de interés al ganglio linfático drenante, que también es el sitio donde se produce la presentación del antígeno a las células T indiferenciadas. IL-12 actúa estimulando a las células T para que proliferen. Al proporcionar la expresión de IL-12 en el mismo sitio (probablemente los mismos ganglios linfáticos) donde se procesa y se presenta el antígeno, es probable que se puedan lograr mayores efectos inmunoestimuladores que los obtenidos mediante la administración de proteína IL-12 soluble, lo que podría esperarse que tenga una alta tasa de difusión, reduciendo así efectivamente la concentración local en el biocompartimento relevante. La VRP de IL-12 tuvo un efecto adyuvante significativamente más fuerte que la administración conjunta de la proteína IL-12 recombinante. Curiosamente, si bien la VRP de IL-12 tuvo una actividad adyuvante clara cuando se administró junto con la proteína, el efecto no se observó cuando la VRP de IL-12 se administró al mismo tiempo que la proteína, pero en la almohadilla de la pata contralateral, lo que indica que el efecto estimulante de IL12 que expresa VRP es un efecto mediado localmente. Los experimentos de PCR de tejidos mostraron que la expresión de VRP del gen de interés continúa durante unos días hasta que la célula que lo expresa sucumbe. Mientras que la proteína soluble desaparece rápidamente por degradación y por difusión, las citocinas expresadas por VRP se producen localmente durante el curso del proceso de presentación del antígeno de una manera que imita la cinética observada cuando las células dendríticas y los macrófagos producen IL-12 durante la infección primaria por el virus. Se puede sugerir que el uso de IL-12 soluble para aumentar las respuestas inmunes en el mismo grado que la VRP de IL-12 requeriría dosis sistémicas mucho más altas, con una mayor reactogenicidad consecuente. Una alternativa a la VRP de IL-12 sería expresar IL-12 a partir de un vector de ADN que podría administrarse mediante inyección con aguja, un enfoque que se ha explorado (Schadeck et al. 2006. Vaccine 24: 4677-4687; Chen et al. 2001 J. Immunol. 166: 7419-7426). Sin embargo, los vectores de ADN pueden dirigirse a diferentes sitios, y la expresión prolongada después de la administración de ADN podría ser problemática en el sentido de que la expresión persistente después de la presentación del antígeno puede conducir a la activación de células T indiferenciadas o a la proliferación de células T autorreactivas. La expresión mediada por VRP, por otro lado, es transitoria y dado que no hay una etapa de ADN en el ciclo del replicón de alfavirus, no hay riesgo de integración.

La dosis óptima para un sujeto determinado y un objetivo de enfermedad determinado se determina fácilmente en base a las enseñanzas de la presente memoria. Una gama de ARP que expresa IL12, digamos de 10^2 a 10^8, se puede ensayar en combinación con el inmunógeno. La dosis óptima para mejorar las respuestas celulares puede no ser siempre la dosis óptima para mejorar las respuestas humorales; si se desean ambas respuestas, es ventajoso ensayar varias concentraciones de IL12-ARPs dentro del rango dado para determinar la respuesta inmune global óptima. Preferiblemente, cuando se expresa el inmunógeno de una ARP, la dosis de IL12-ARP coadministrada con la ARP que expresa el inmunógeno no excede la dosis de ARP que expresa el inmunógeno, y es típicamente la misma dosis.

Optimización del uso de VRP adyuvantes en primates no humanos

Las VRPs se ensayan en un modelo de primates no humanos. Además de la optimización, estos estudios incluyen la monitorización de la toxicidad y la caracterización de los efectos reductores de la dosis debido a los adyuvantes de

VRP. Para este propósito, se utilizan vacunas contra la gripe existentes, como la vacuna trivalente contra la gripe (TIV) o una vacuna de H5 Indonesia inactivada, y se miden las respuestas inmunes funcionales a las cepas de la gripe A. Tanto la versión humana como la simia de IL-12 se clonan y se empaquetan en VRPs para los estudios posteriores. Si bien las citocinas humanas generalmente muestran bioactividad en primates no humanos, estos experimentos utilizan citocinas de la misma especie (macacos Rhesus de origen chino) para minimizar el riesgo de romper la tolerancia contra la citocina propiamente dicha.

Evaluación de la actividad adyuvante de VRP de IL-12 en primates no humanos

Se inmunizan grupos de cuatro animales (macacos Rhesus) con 3 dosis de vacuna antigripal inactivada con y sin la administración conjunta de VRP adyuvante.

Tabla 5. Diseño experimental para estudios animales

	1	2	3	4	5	6	Animales
Vacuna inactivada contra la gripe	15 µg	1,5 µg	0,15 µg	15 µg	1,5 µg	0,15 µg	
VRP adyuvante				1e7	1e7	1e7	
Nº de animales	4	4	4	4	4	4	24
Total							24

Optimización de la cantidad de VRP de IL-12 requerida en primates no humanos para lograr al menos una actividad adyuvante reductora de la dosis de 10 veces

Se inmunizan grupos de cuatro animales (macacos Rhesus) con una dosis fija de gripe H5 inactivada / Indonesia y se les co-administra VRP de IL-12 a diferentes dosis. La dosis exacta utilizada está entre aproximadamente 1 y 100 µg, deseablemente entre 1 y 15 µg.

Tabla 6. Diseño experimental para estudios animales

	1	2	3	4	5	6	Animales
Vacuna inactivada contra la gripe	15 µg	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg	
VRP adyuvante			1e5	1e6	1e7	1e8	
Nº de animales	4	4	4	4	4	4	24
Total							24

Optimización y caracterización del efecto de VRP de IL-12 como adyuvantes reductores de la dosis para vacunas contra la gripe estacional en ratones

Los productos de expresión de HA baculovirus se usaron para definir la dosis óptima de ARP de IL-12 para el uso con vacunas proteicas (véanse las Figs. 5 y 6); se cree que las preparaciones de proteínas recombinantes compradas para el uso en los experimentos descritos en la presente memoria contuvieron compuestos adyuvantes convencionales). De manera similar, las vacunas contra la gripe ("TIV") de producto dividido, con licencia, se usaron para definir los regímenes de inmunización óptimos necesarios para lograr los mismos efectos adyuvantes con estas vacunas disponibles comercialmente. Se estudiaron diversas proporciones del vector de IL-12 y de la vacuna contra la gripe y el efecto de reducción de la dosis general respecto de la vacuna sola después de una o dos inmunizaciones para la generación de respuestas de inmunidad humoral (Figs. 11-12) y celular (Figs. 13-14). En estudios de dosis-respuesta, se determinó el efecto adyuvante relativo de la IL-12 vectorizada con replicón y la citocina de IL-12 preformada soluble. En estos estudios, se monitorizaron los niveles séricos de IL-12 en ambos grupos de ratones para demostrar que el enfoque de IL-12 vectorizada es efectivo con niveles sistémicos mucho más bajos de IL-12, ya que su producción y efecto adyuvante se limitarían a los ganglios que drenan el sitio de inoculación. También se monitorizaron las respuestas de anticuerpos (ELISA) así como las respuestas celulares (IFNγ ELISPOT) después de las inmunizaciones.

Las VRPs que expresaban Interleucina-12 murina (mIL-12) funcionaron como adyuvante altamente potente para la proteína HA co-administrada de los virus de la gripe tipo A de los serotipos H3 y H1, así como otros antígenos proteicos, incluido un antígeno asociado a tumores. Se realizaron estudios preclínicos en ratones para determinar las cantidades óptimas de VRP de IL-12 y antígenos de gripe (TIV preparadas a partir de cepas de gripe inactivadas) para incluirlos en los adyuvantes de VRP. En la Fig. 12, como ejemplo, se observó al menos un efecto de reducción de la dosis de 1000 veces usando 1 x 10^6 UI de VRP de IL-12 en combinación con TIV (compárese la barra nº 4 con la barra nº 5).

La actividad de reducción de la dosis de VRP de IL-12 se ensayó en combinación con vacunas inactivadas para la gripe estacional. Los resultados se presentan en las Figs. 11-14. Los ratones recibieron una o dos inmunizaciones a intervalos de cuatro semanas, y las respuestas inmunes humorales se monitorizaron después de cada inmunización. Las respuestas celulares de células T se midieron mediante ELISPOT a los 7 días de la inmunización post-sensibilización en ratones con las cantidades de TIV y de VRP de IL12 como se describe en las Figs. 11 y 12, arriba. Al cabo de 1 semana post-sensibilización, se sacrificaron los ratones y se analizó la frecuencia de SFC de interferón gamma de los esplenocitos en respuesta a una superposición de bibliotecas de péptidos generadas para corresponder a las secuencias de aminoácidos de HA Wyoming (Fig. 13) y Neuraminidasa Wyoming (NA, Fig. 14). La adición de VRP de IL-12 mejora significativamente las respuestas inmunes adaptativas a los componentes de la TIV. La TIV sola no logró inducir respuestas detectables de células T incluso a la dosis más alta de 1000 ng, mientras que la dosis más baja ensayada provocó respuestas cuando se mezcló con VRP de IL-12.

Los estudios presentados en las Figs. 11-14 demostraron los efectos de reducción de la dosis en las vacunas inactivadas o basadas en subunidades para provocar respuestas inmunitarias funcionales y protectoras contra el virus de la gripe estacional (H1 y / o H3) y potencialmente pandémico (H5).

Generación de construcciones de replicón de alfavirus que contienen las subunidades p35 y p40 de IL-12 murina, en forma de un marco de lectura abierto único unido

Un gen de IL-12 murino de cadena sencilla, que contenía las subunidades p40 y p35 de IL-12, se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pORF-mIL-12 (p40-35) (Invivogen) y se clonó en replicones con IRES y sin IRES.

Tabla 7. Oligonucleótidos útiles como cebadores.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Utilidad
mouseIL12ecorvfor	CGGATATCATGGCCTGTCCTCAGAAGC (SEQ ID Nº:1)	Estos cebadores se usaron para amplificar mediante PCR y clonar mIL-12 en dos replicones que no contienen IRES, pERK y pERK-3, usando los sitios de restricción EcoRV y AscI.
mouseIL12rev	CGGGCGCGCCTTAGGCGGAGCTCAGATAG (SEQ ID Nº:2)	
mil12bamfor	TCGGATCCATGGCCTGTCCTCAGAAGC (SEQ ID Nº:3)	Para generar replicones con IRES que contienen replicones de mIL-12, el gen se amplificó inicialmente con estos cebadores y se clonó en un vector de transferencia que contenía IRES pcDNA3.3 / EV71-MS usando sitios BamHI. La construcción resultante se digirió luego con AscI para liberar el segmento MS IRES / IL-12 que luego se clonó en seis plásmidos PeRK diferentes que contenían rellenos de diferentes longitudes: 257, 342, 357, 383, 579 y 749.
mil12bamrev	CCGGATCCTTAGGCGGAGCTCAGATAGC (SEQ ID Nº:4)	
	Los sitios de restricción están subrayados	

Secuencia codificante de IL-12 de cadena sencilla murina de Invivogen (SEQ ID Nº: 5)

atggcctgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtgggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactg
gactcccgatgcccctggagaaacagtgaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagtcataggctctgg
aaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgccacaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaag
gaaaatggaatttggtccactgaaatttttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggacggttcacgtgctcatggctggtgca
aagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcagtccccccgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactg
gaccaaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggagaccctgcccattgaactggcgttggaagcacggcag
cagaataaatatgagaactacagcaccagcttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactcacaggtg
gaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagttctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacaga
ggaggggtgtaaccagaaaggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaagctcaggatcgctattacaat
tcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagagtccgatcggttcctggagtaggggtacctggagtgggcagggtcataccggtctctggacctgccaggtgtc

ttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaagacggccagagaaaagctgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatcatgaag
acatcacacgggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaagaacgagagttgcctggctactagagagacttcttccacaacaagag
ggagctgcctgccccacagaagacgtctttgatgatgaccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccatcaacgca
gcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgctggtggccatcgatgagctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgcca
gaaacctcctgtgggagaagcagacccttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaacagggtgatgggct
atctgagctccgcctaa

La siguiente discusión y definiciones se proporcionan para mejorar la claridad de la presente descripción para un experto en la técnica relevante.

En el contexto de la presente solicitud, nm significa nanómetro, mL significa mililitro, EEV significa Virus de la encefalitis equina venezolana, EMC significa Virus de la encefalomiocarditis, BHK significa células de riñón de cría de hámster, HA significa gen de hemaglutinina, GFP significa gen de proteína fluorescente verde, N significa nucleocápside, FACS significa clasificador de células activado por fluorescencia, IRES significa sitio interno de entrada al ribosoma, UFP significa unidades formadoras de placa, UI significa unidades infecciosas, y FBS significa suero bovino fetal. La expresión "número de aminoácido de E2 (por ejemplo, Lys, Thr, etc.)" indica el aminoácido designado en el residuo designado de la proteína E2, y también se usa para referirse a los aminoácidos en residuos específicos en las proteínas E3 o E1.

Como se usa en la presente memoria, el término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica e incluye las diversas especies, tales como virus de EEV, virus Semliki Forest (SFV), Sindbis, virus Ross River, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina oriental, Virus Chikungunya, SA AR86, Virus Everglades, Virus Mucambo, Virus Barmah Forest, Virus Middleburg, Virus Pixuna, Virus O'nyong-nyong, Virus Getah, Virus Sagiyama, Virus Bebaru, Virus Mayaro, Virus Una, Virus Aura, Virus Whataroa, Virus Banbanki, Virus Kyzylagach, Virus Highlands J, Virus Fort Morgan, Virus Ndumu y Virus Buggy Creek. Los alfavirus utilizados en las construcciones y usos descritos en la presente memoria son EEV. Otros alfavirus incluyen SA AR86, Sindbis (por ejemplo, TR339, véase la patente de EE.UU. nº 6.008.035) y SFV.

Los términos "secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus de 5'" y "secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus de 3'" se refieren a las secuencias encontradas en alfavirus, o secuencias derivadas de ellas, que son reconocidas por las proteínas de replicasa de alfavirus no estructurales y que conducen a la replicación del ARN viral. A veces se les conoce como los extremos 5' y 3', o secuencias de alfavirus de 5' y 3'. El uso de estos extremos 5' y 3' da como resultado la replicación de la secuencia de ARN codificada entre los dos extremos. La secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus de 3' como se encuentra en el alfavirus es típicamente de aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, que contiene una secuencia mínima de reconocimiento de replicación de 3' mejor definida. La secuencia mínima de reconocimiento de replicación de 3', conservada entre los alfavirus, es una secuencia de 19 nucleótidos (Hill et al., J. Virology, 2693-2704, 1997). Estas secuencias pueden modificarse mediante técnicas de biología molecular habituales para minimizar aún más el potencial de recombinación o para introducir sitios de clonación, con la condición de que deben ser reconocidas por la maquinaria de replicación de alfavirus.

El término "secuencia mínima de reconocimiento de replicación de alfavirus de 5'" se refiere a la secuencia mínima que permite el reconocimiento por las proteínas no estructurales del alfavirus, pero que no da como resultado un empaquetamiento / recombinación significativa de las moléculas de ARN que contienen la secuencia. En una realización preferida, la secuencia mínima de reconocimiento de replicación de alfavirus de 5' da como resultado una disminución de cincuenta a cien veces en la frecuencia observada de empaquetamiento / recombinación del ARN que contiene esa secuencia. El empaquetamiento / recombinación de auxiliares puede evaluarse mediante varios métodos, por ejemplo, el método descrito por Lu y Silver (J. Virol. Methods 2001, 91 (1): 59-65).

Los términos "replicón de ARN de alfavirus", "ARN de replicón de alfavirus", "replicón de vector de ARN de alfavirus" y "ARN de replicón de vector" se usan indistintamente para referirse a una molécula de ARN que expresa genes de proteínas no estructurales de modo que pueda dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, secuencias de reconocimiento de replicación de alfavirus de 5' y 3' (que pueden ser las secuencias mínimas, como se definió anteriormente, pero alternativamente pueden ser las regiones completas del alfavirus), secuencias de codificación para proteínas no estructurales de alfavirus, y un tramo de poliadenilación. Además, puede contener uno o más elementos para dirigir la expresión, es decir, la transcripción y la traducción, de una secuencia de ARN heterólogo. También se puede diseñar para expresar proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (como se cita en los antecedentes), Smith et al. (publicación de patente internacional WO 2004/085660) y Smith et al. (patente de EE.UU. nº 7.045.335) describen numerosas construcciones para dichos replicones de ARN de alfavirus. Las realizaciones específicas de los replicones de ARN de alfavirus pueden contener una o más mutaciones atenuadoras, y una mutación atenuadora es una deleción, adición o sustitución de nucleótidos de uno o más nucleótidos, o una mutación que comprende un reordenamiento o construcción quimérica que da como resultado una pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación en comparación con el alfavirus de tipo natural apropiado. Los ejemplos de una sustitución de nucleótidos atenuadora (que da como resultado un cambio de aminoácidos en el replicón) incluyen una mutación en la posición de aminoácidos nsP1 538, la posición de aminoácidos nsP2 96 o la posición de aminoácidos nsP2 372 en el alfavirus SAAR86, y un ejemplo de una mutación atenuadora en la región no codificante del ácido nucleico del replicón es la sustitución de A o C en el nucleótido 3 en EEV.

Los términos "proteína(s) estructural(es) de alfavirus" se refieren a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas las produce el virus en forma de una poliproteína, y generalmente se representan en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación / transporte de membrana para las dos glucoproteínas, E2 y E1. Por lo tanto, el uso del término E1 en la presente memoria puede referirse a E1, E3-E1, 6k-E1 o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria puede referirse a E2, E3-E2, 6k-E2 o E3-6k-E2. Las mutaciones atenuadoras pueden introducirse en una o más de las proteínas estructurales de alfavirus.

El término "auxiliar(es)" o "construcción(es) auxiliar(es)" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (como se cita en los antecedentes), Smith et al (publicación de patente internacional WO 2004/085660) y Smith et al. (patente de EE.UU. nº 7.045.335) describen numerosas construcciones auxiliares útiles para expresar proteínas estructurales de alfavirus en la producción de ARPs.

Los términos "célula auxiliar" y "célula de empaquetamiento" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a la célula en la que se producen partículas de replicón de alfavirus. La célula auxiliar comprende un conjunto de auxiliares que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus. Como se describe en la presente memoria, los auxiliares pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquier célula que sea permisiva para el alfavirus, es decir, células que sean capaces de producir partículas de alfavirus tras la introducción de un transcrito de ARN viral. Las células permisivas para alfavirus incluyen, entre otras, células Vero, de riñón de cría de hámster (BHK), 293, 293T, fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y de ovario de hámster chino (CHO). En ciertas realizaciones, la célula auxiliar o empaquetadora puede incluir adicionalmente una ARN polimerasa dependiente de ARN heterólogo y / o una proteasa específica de secuencia. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales del alfavirus pueden estar presentes en la célula auxiliar de forma transitoria o mediante una integración estable en el genoma de la célula auxiliar. El ácido nucleico que codifica las proteínas estructurales de alfavirus que se usan para producir partículas de alfavirus puede estar bajo el control de promotores constitutivos y / o inducibles. En una realización, las secuencias de codificación de la proteína estructural del alfavirus pueden proporcionarse en un único auxiliar de ADN (véase Smith et al., patente de EE. UU. nº 7.045.335) o como dos construcciones auxiliares que comprenden un elemento IRES en el que puede controlarse la traducción de estas secuencias de codificación mediante la actividad de un elemento IRES. En tales realizaciones, el elemento IRES puede estar activo en el tipo de célula auxiliar específico y no activo, o mínimamente activo en otros tipos de células. En realizaciones particulares, las células auxiliares comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas estructurales de alfavirus en una combinación y / o cantidad suficiente para producir una partícula de alfavirus cuando se introduce un ácido nucleico de replicón recombinante en la célula en condiciones por las cuales se producen las proteínas estructurales de alfavirus y el ácido nucleico del replicón recombinante se empaqueta en las partículas de alfavirus descritas en la presente memoria.

Los términos "partículas de replicón de alfavirus", "partículas de replicón de virus" o "partículas de alfavirus recombinante", usados indistintamente en la presente memoria, significan un complejo estructural similar a un virión que incorpora un ARN de replicón de alfavirus que expresa una o más secuencias de ARN heterólogas. Típicamente, el complejo estructural de tipo virión incluye una o más proteínas estructurales de alfavirus incrustadas en una envoltura lipídica que encierra una nucleocápside que a su vez encierra el ARN. La envoltura lipídica deriva típicamente de la membrana plasmática de la célula en la que se producen las partículas. Preferiblemente, el ARN del replicón de alfavirus está rodeado por una estructura de nucleocápside compuesta por la proteína de la cápside de alfavirus, y las glucoproteínas de alfavirus están incrustadas en la envoltura lipídica derivada de la célula. Las proteínas estructurales y el ARN del replicón pueden derivarse de los mismos o diferentes alfavirus. En una realización específica, el ARN del replicón y las proteínas estructurales son de EEV, por ejemplo, véase Smith et al., publicación de patente de EE.UU. 2005-0266550. En otra realización, el ARN del replicón deriva de EEV y las proteínas estructurales derivan del virus Sindbis (véase, por ejemplo, Dubensky et al., patente de EE.UU. nº 6.376.236). Las partículas de replicón de alfavirus son infecciosas pero deficientes de propagación, es decir, el ARN del replicón no puede propagarse más allá de la célula huésped en la que las partículas infectan inicialmente, en ausencia de los ácidos nucleicos auxiliares que codifican las proteínas estructurales de alfavirus.

Se emplea un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de ADN, es decir, una ARN polimerasa dependiente de ADN, para producir el replicón de alfavirus y los ácidos nucleicos auxiliares proporcionados en la presente memoria. En el presente contexto, un promotor es una secuencia de nucleótidos reconocida por una polimerasa y suficiente para causar la transcripción de una secuencia asociada (en posición posterior). En algunas realizaciones, el promotor es constitutivo (véase más abajo). Alternativamente, el promotor puede estar regulado, es decir, no actuar constitutivamente para causar la transcripción de la secuencia asociada. Si es inducible, hay secuencias presentes que median en la regulación de la expresión, de modo que la secuencia asociada se transcribe solo cuando (i) una molécula inductora está presente en el medio en el que se cultivan las células, o (ii) las condiciones a las que las células están expuestas se cambian para que sean condiciones inductoras. En el presente contexto, una secuencia reguladora de la transcripción incluye una secuencia promotora, y puede incluir además secuencias activas en cis para la expresión regulada de una secuencia asociada en respuesta a señales ambientales.

En ciertas realizaciones de los ARNs del replicón y auxiliares, la transcripción y traducción se controlan por separado mediante diferentes elementos reguladores. El replicón contiene un promotor que dirige la transcripción; un elemento IRES; y una secuencia codificante (por ejemplo, para una proteína o fragmento heterólogo), en la que el elemento

IRES está operativamente ubicado de tal manera que la traducción de la secuencia codificante se realiza a través de un mecanismo independiente de la caperuza dirigido por el elemento IRES y no a través de un mecanismo dependiente de la caperuza. El término "transcripción", como se usa en la presente memoria, incluye la producción de ARN a partir de un promotor subgenómico de alfavirus de un ácido nucleico de replicón recombinante, que en sí mismo puede ser una molécula de ARN. Es decir, el promotor subgenómico en un replicón recombinante o una molécula de ARN auxiliar puede dirigir la transcripción de un ARN mensajero que codifica un ácido nucleico heterólogo de interés o una proteína estructural de alfavirus. Por separado, el replicón recombinante o el ácido nucleico auxiliar pueden "replicarse", es decir, copiarse desde la secuencia de reconocimiento de replicación de 5' hacia la secuencia de reconocimiento de replicación.

En las realizaciones de auxiliares de ARN y para producir el ARN del replicón, se utiliza un promotor para sintetizar ARN en una reacción de transcripción *in vitro*, y los promotores específicos adecuados para este uso incluyen los promotores de ARN polimerasa SP6, T7 y T3. En las realizaciones de auxiliares de ADN, el promotor funciona dentro de una célula para dirigir la transcripción del ARN. Los promotores potenciales para la transcripción *in vivo* de la construcción incluyen promotores eucariotas tales como promotores de ARN polimerasa II, promotores de ARN polimerasa III o promotores virales como MMTV y LTR de MoSV, región temprana de SV40, RSV o CMV. Muchos otros promotores mamíferos y virales adecuados están disponibles en la técnica. Alternativamente, los promotores de ARN polimerasa dependientes de ADN de bacterias o bacteriófagos, por ejemplo SP6, T7 y T3, pueden emplearse para el uso *in vivo*, y se proporciona la ARN polimerasa correspondiente a la célula, ya sea a través de un plásmido, un vector de ARN o un vector viral. En una realización específica, la ARN polimerasa correspondiente se puede transformar de manera estable en una línea celular auxiliar bajo el control de un promotor inducible.

En ciertas construcciones, el control de la expresión de ácido nucleico a nivel de traducción se logra mediante la introducción de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en posición posterior al promotor, por ejemplo, el promotor subgenómico del alfavirus 26S, y en posición anterior a la secuencia codificante, por ejemplo, para la secuencia heteróloga o una proteína estructural de alfavirus a traducir. El elemento IRES se coloca de manera que dirige la traducción del ARNm, minimizando, limitando o evitando así el inicio de la traducción del ARNm desde la estructura (5')pppN de metil-7-guanosina presente en el extremo 5' del ARNm subgenómico (la "caperuza"). Estas construcciones dan como resultado que el IRES controle la traducción de una secuencia heteróloga independientemente de la transcripción dirigida por el promotor. Se pueden emplear IRES de muchas fuentes diferentes, incluidos elementos IRES virales de picornavirus, por ejemplo, poliovirus (PV) o el enterovirus humano 71, por ejemplo, cepas 7423 / MS / 87 y BrCr de los mismos; del virus de la encefalomiocarditis (EMCV); del virus de la fiebre aftosa (FMDV); de flavivirus, por ejemplo, virus de la hepatitis C (VHC); de pestivirus, por ejemplo, el virus de la peste porcina clásica (CSFV); de retrovirus, por ejemplo, virus de leucemia murina (MLV); de lentivirus, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia simia (SIV); de elementos de IRES de ARNm celulares tales como los de factores de iniciación de la traducción, por ejemplo, eIF4G o DAP5; de factores de transcripción, por ejemplo, c-Myc o factor represor de NF-κB (NRF); de factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF B); de genes homeóticos, por ejemplo, Antennapedia; de proteínas de supervivencia, por ejemplo, inhibidor de apoptosis ligado a X (XIAP) o Apaf-1; de chaperonas, por ejemplo, proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina BiP, virus vegetales, así como cualquier otro elemento IRES conocido ahora o posteriormente.

Las preparaciones de ARP que expresan IL-12 se usan como adyuvante con otras preparaciones inmunogénicas. Dichas preparaciones inmunogénicas pueden incluir un antígeno, un polipéptido o péptido inmunógeno o inmunogénico, una proteína de fusión, un péptido de fusión, un antígeno tumoral o canceroso, un polipéptido anormal responsable de una enfermedad, por ejemplo, del Alzheimer. Los ejemplos de dichos polipéptidos y péptidos inmunogénicos son adecuados para proteger a un sujeto contra una enfermedad, incluidas, entre otras, enfermedades microbianas, bacterianas, protozoarias, parasitarias y virales. Estas preparaciones inmunogénicas pueden estar en forma de una proteína purificada o fragmentos de proteína extraídos de la fuente (es decir, el virus, procariota o eucariota); ADN capaz de expresar tales moléculas inmunogénicas; preparaciones de virus inactivados tales como TIV y vectores virales o bacterianos que expresan tales moléculas inmunogénicas.

Todos los aminoácidos que aparecen en las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la memoria descriptiva tienen sus abreviaturas habituales de tres y una letra utilizadas habitualmente en la técnica: A, Ala, Alanina; C, Cys, Cisteína; D, Asp, ácido aspártico; E, Glu, ácido glutámico; F, Phe, Fenilalanina; G, Gly, Glicina; H, His, histidina; I, Ile, isoleucina; K, Lys, Lisina; L, Leu, Leucina; M, Met, metionina; N, Asn, Asparagina; P, Pro, Prolina; Q, Gln, Glutamina; R, Arg, Arginina; S, Ser, Serina; T, Thr, treonina; V, Val, Valina; W, Try, triptófano; Y, Tyr, tirosina.

Como se usa en la presente memoria, la expresión dirigida por una secuencia particular es la transcripción de una secuencia en posición posterior asociada. Si es apropiado y deseado para la secuencia asociada, el término expresión también abarca la traducción (síntesis de proteínas) del ARN transcrito o introducido. Alternativamente, se pueden usar diferentes secuencias para dirigir la transcripción y la traducción.

Las células permisivas de alfavirus empleadas en los usos actuales son células que, tras la transfección con un transcrito de ARN viral completo, son capaces de producir partículas virales. Los alfavirus tienen un amplio rango de huéspedes. Los ejemplos de células de empaquetamiento adecuadas incluyen, pero sin limitación, células Vero, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de fibroblastos de embrión de pollo, células DF-1, 293, 293T, células

de ovario de hámster chino (CHO) y células de insectos.

Las frases "proteína estructural" o "proteína estructural de alfavirus", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a una o más de las proteínas codificadas alfavirales que se requieren para el empaquetamiento del replicón de ARN, y típicamente incluyen la proteína de la cápside, la glucoproteína E1 y la glucoproteína E2 del alfavirus maduro (ciertos alfavirus, como el virus Semliki Forest, contienen una proteína adicional, E3, en la capa madura). El término "proteína(s) estructural(es) de alfavirus" se refiere a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estos se sintetizan (a partir del genoma viral) como una poliproteína y se representan generalmente en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación / transporte de membrana para las dos glucoproteínas, E2 y E1. Por lo tanto, el uso del término E1 en la presente memoria puede referirse a E1, E3-E1, 6k-E1 o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria puede referirse a E2, E3-E2, 6k-E2 o E3-6k-E2.

Las proteínas estructurales del alfavirus se distribuyen entre una o más moléculas de ácido nucleico auxiliar (por ejemplo, un primer ARN auxiliar (o ADN) y un segundo ARN auxiliar (o ADN). Además, una o más proteínas estructurales pueden estar ubicadas en la misma molécula que el ácido nucleico del replicón, siempre que al menos una proteína estructural se elimine del ARN del replicón de manera que el replicón y la partícula de alfavirus resultante sean deficientes de replicación. Como se usa en la presente memoria, los términos "delecionado" o "deleción" significan la deleción total del segmento especificado o la deleción de una parte suficiente del segmento especificado para hacer que el segmento no operativo o no funcional, de acuerdo con el uso habitual. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.650.764 de Temin et al. La expresión "deficiente de replicación", como se usa en la presente memoria, es sinónimo de "deficiente de propagación", y significa que las partículas producidas en una célula huésped dada no pueden producir partículas de progenie en la célula huésped, debido a la ausencia de la función auxiliar, es decir, las proteínas estructurales de alfavirus requeridas para empaquetar el ácido nucleico del replicón. Sin embargo, el ácido nucleico del replicón es capaz de replicarse y expresarse dentro de la célula huésped en la que se ha introducido.

Los métodos para la producción económica y eficiente de partículas de alto rendimiento se describen en la patente de EE.UU. nº 7.078.218, expedida el 18 de julio de 2006, al igual que las cepas y virus atenuados específicos útiles para la expresión de una secuencia codificante de IL-12 expresable.

La célula auxiliar, también conocida como célula de empaquetamiento, utilizada para producir las partículas de alfavirus deficientes de replicación infecciosas, debe expresar o ser capaz de expresar proteínas estructurales de alfavirus suficientes para empaquetar el ácido nucleico del replicón. Las proteínas estructurales se pueden producir a partir de un conjunto de ARNs, típicamente dos que se introducen en la célula auxiliar concomitantemente con o antes de la introducción del vector replicón. El primer ARN auxiliar incluye ARN que codifica al menos una proteína estructural de alfavirus pero no codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. El primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus, pero no codifica la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus. Alternativamente, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E2 de alfavirus, pero no codifica la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E1 de alfavirus. En una realización adicional, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus, pero no la proteína de la cápside de alfavirus. En una cuarta realización, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la cápside de alfavirus, pero ninguna de las glicoproteínas de alfavirus. En una quinta realización, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la cápside y una de las glicoproteínas, es decir, E1 o E2, pero no ambas.

En combinación con cualquiera de estos primeros ARN auxiliares, el segundo ARN auxiliar codifica al menos una proteína estructural de alfavirus no codificada por el primer ARN auxiliar. Por ejemplo, cuando el primer ARN auxiliar codifica solo la glucoproteína E1 del alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede codificar una o ambas proteínas de la cápside de alfavirus y la glucoproteína E2 de alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica solo la proteína de la cápside de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede incluir el ARN que codifica una o ambas glicoproteínas de alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica solo la glicoproteína E2 de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede codificar una o ambas proteínas de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E1 de alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica la glucoproteína E1 y la cápside de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede incluir ARN que codifica una o ambas proteínas de la cápside de alfavirus y la glucoproteína E2 de alfavirus.

En los ácidos nucleicos auxiliares, se entiende que estas moléculas comprenden además las secuencias necesarias para la expresión (que abarca la traducción y, cuando sea apropiado, señales de transcripción o replicación) de las secuencias de proteínas estructurales codificadas en las células auxiliares. Dichas secuencias pueden incluir, por ejemplo, promotores (elementos virales, procariotas o eucariotas, inducibles o constitutivos), elementos IRES y secuencias de reconocimiento de replicasa viral de 5' y 3'. En el caso de los ácidos nucleicos auxiliares que expresan una o más glicoproteínas, se entiende a partir de la técnica que estas secuencias se expresan ventajosamente con una secuencia líder o secuencia señal en el extremo N-terminal de la región codificante de proteínas estructurales en las construcciones de ácido nucleico. La secuencia líder o secuencia señal puede derivar de alfavirus, por ejemplo E3 o 6k, o puede ser una secuencia heteróloga tal como un péptido señal activador de plasminógeno tisular o una secuencia sintética. Por lo tanto, como ejemplo, un primer ácido nucleico auxiliar puede ser una molécula de ARN que codifica la cápside-E3-E1, y el segundo ácido nucleico auxiliar puede ser una molécula de ARN que codifica la cápside-E3-E2. Alternativamente, el primer ARN auxiliar puede codificar la cápside sola, y el segundo ARN auxiliar puede

codificar E3-E2-6k-E1. Además, la señal de empaquetamiento o "secuencia de encapsidación" que está presente en el genoma viral no está presente en todos los ácidos nucleicos auxiliares. Preferiblemente, la señal de empaquetamiento se elimina de todos los ácidos nucleicos auxiliares.

Estos auxiliares de ARN pueden introducirse en las células de varias maneras. Se pueden expresar a partir de uno o más casetes de expresión que se han transformado de manera estable en las células, estableciendo así líneas celulares de empaquetamiento (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.242.259). Alternativamente, los ARN pueden introducirse como moléculas de ARN o ADN que pueden expresarse en la célula auxiliar sin integrarse en el genoma celular. Los métodos de introducción incluyen electroporación, vectores virales (por ejemplo, SV40, adenovirus, nodavirus, astrovirus) y transfección mediada por lípidos.

Una alternativa a los ARN auxiliares múltiples es el uso de una sola molécula de ADN, que codifica todos los polipéptidos necesarios para empaquetar el ARN del replicón viral en partículas infecciosas de replicón de alfavirus. El único auxiliar de ADN puede introducirse en la célula de empaquetamiento por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, electroporación, transfección mediada por lípidos (lipofección), vector viral (por ejemplo, adenovirus o SV-40) o transfección mediada por fosfato de calcio. Preferiblemente, el ADN se introduce mediante los métodos basados en electroporación. El ADN generalmente se electropora en células con una disminución en el voltaje y un aumento en la capacitancia, en comparación con lo requerido para la absorción de ARN. En todas las electroporaciones, el valor del voltaje y la capacitancia debe establecerse para evitar destruir la capacidad de las células de empaquetamiento (huésped) de producir partículas infecciosas de alfavirus. Alternativamente, la función auxiliar, en este formato y bajo un promotor inducible, puede incorporarse en el genoma de la célula de empaquetamiento antes de la introducción / expresión del replicón del vector de ARN, y luego inducirse con el estímulo apropiado justo antes, de manera concomitante con, o después de la introducción del vector replicón de ARN.

Ventajosamente, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales del alfavirus, es decir, la cápside, la glicoproteína E1 y la glicoproteína E2, o la construcción de replicón, contienen una o más mutaciones atenuadoras. Las frases "mutación atenuadora" y "aminoácido atenuador", como se usan en la presente memoria, significan una mutación de nucleótidos (que puede o no estar en una región del genoma viral que codifica polipéptidos) o un aminoácido codificado por una mutación de nucleótidos, que en el contexto de un virus vivo, resulta en una disminución de la probabilidad de que el alfavirus cause enfermedad en su huésped (es decir, una pérdida de virulencia), de acuerdo con la terminología habitual en la técnica, véase, por ejemplo, B. Davis, et al., Microbiology 156-158, (4ª ed. 1990), si la mutación es una mutación de sustitución o una mutación de deleción o adición en el marco de lectura. La frase "mutación atenuadora" excluye las mutaciones que serían letales para el virus, a menos que dicha mutación se use en combinación con una mutación "restauradora" que haga que el virus sea viable, aunque atenuado. Los métodos para identificar mutaciones atenuadoras adecuadas en el genoma de alfavirus se conocen en la técnica. Olmsted et al. (1984; Science 225: 424) describe un método para identificar mutaciones atenuadoras en el virus Sindbis seleccionando un crecimiento rápido en cultivo celular. Johnston y Smith (1988; Virology 162: 437) describen la identificación de mutaciones atenuadoras en EEV mediante la aplicación de presión selectiva directa para la penetración acelerada de las células BHK. Las mutaciones atenuadoras en alfavirus se han descrito en la técnica, por ejemplo, White et al. 2001 J. Virology 75: 3706; Kinney et al. 1989 Virology 70:19; Heise et al. 2000 J. Virology 74: 4207; Bernard et al. 2000 Virology 276: 93; Smith et al. 2001 J. Virology 75: 11196; Heidner y Johnston 1994 J. Virology 68: 8064; Klimstra et al. 1999 J. Virology 73: 10387; Glasgow et al. 1991 Virology 185: 741; Polo y Johnston 1990 J. Virology 64: 4438; y Smerdou y Liljestrom 1999 J. Virology 73: 1092.

En ciertas realizaciones, el ARN del replicón comprende al menos una mutación atenuadora. En otras realizaciones específicas, los ácidos nucleicos auxiliares incluyen al menos una mutación atenuadora. En realizaciones que comprenden dos moléculas de ácido nucleico auxiliares, al menos una molécula incluye al menos una mutación atenuadora, o ambas pueden codificar al menos una mutación atenuadora. Alternativamente, el ácido nucleico auxiliar, o al menos uno del primer o segundo ácidos nucleicos auxiliares, incluye al menos dos, o múltiples, mutaciones atenuadoras. Las mutaciones atenuadoras apropiadas dependen del alfavirus utilizado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es EEV, pueden seleccionarse mutaciones atenuadoras adecuadas del grupo que consiste en codones en la posición de aminoácido de E2 76 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente lisina, arginina o histidina como el aminoácido de E2 76; codones en la posición de aminoácido de E2 120 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente lisina como el aminoácido de E2 120; codones en la posición de aminoácido de E2 209 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente lisina, arginina o histidina como el aminoácido de E2 209; codones en el aminoácido de E1 272 que especifican una mutación atenuadora, preferiblemente treonina o serina como el aminoácido de E1 272; codones en el aminoácido de E1 81 que especifican una mutación atenuadora, preferiblemente isoleucina o leucina como el aminoácido de E1 81; y codones en el aminoácido de E1 253 que especifican una mutación atenuadora, preferiblemente serina o treonina como el aminoácido de E1 253. Las mutaciones atenuadoras adicionales incluyen deleciones o mutaciones por sustitución en el dominio de escisión entre E3 y E2, de manera que la poliproteína E3 / E2 no se escinde; esta mutación en combinación con la mutación en E1-253 se puede usar en los usos y composiciones actuales. De manera similar, pueden usarse mutaciones presentes en las cepas de vacunas vivas existentes, por ejemplo, la cepa TC83 (véase Kinney et al., 1989, Virology 170: 19-30, particularmente la mutación en el nucleótido 3).

Cuando el alfavirus es el Arbovirus de Sudáfrica Nº 86 (SA AR86), se pueden seleccionar mutaciones atenuadoras adecuadas del grupo que consiste en codones en la posición de aminoácido de nsP1 538 que especifican un

aminoácido atenuador, preferiblemente isoleucina como el aminoácido de nsP1 538; codones en la posición de aminoácido de E2 304 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente treonina como el aminoácido de E2 de la posición 304; codones en la posición de aminoácido de E2 314 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente lisina como el aminoácido de E2 314; codones en la posición de aminoácido de E2 376 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente alanina como el aminoácido de E2 376; codones en la posición de aminoácido de E2 372 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente leucina como el aminoácido de E2 372; codones en la posición de aminoácido de nsP2 96 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente glicina como el aminoácido de nsP2 96; y codones en la posición de aminoácido de nsP2 372 que especifican un aminoácido atenuador, preferiblemente valina como el aminoácido de nsP2 372. Los expertos en la técnica conocen mutaciones atenuadoras adecuadas útiles en realizaciones en las que se emplean otros alfavirus.

Las mutaciones atenuadoras pueden introducirse en el ARN realizando mutagénesis dirigida en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones en el ARN mediante la sustitución de fragmentos de restricción homólogos en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos, o en copias de ADNc usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa mutagénica.

En las partículas de replicón de alfavirus (ARP), un vector de alfavirus, en la presente memoria denominado replicón, está diseñado para contener y expresar uno o más genes de interés, donde el gen de interés puede codificar IL-12, o en el caso de la preparación de antígeno en la que actúa como adyuvante VRP que expresa IL-12, el antígeno. El vector replicón de alfavirus puede derivar de cualquier alfavirus, como el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), el virus Sindbis, por ejemplo, la cepa TR339, el arbovirus sudafricano nº 86 y el virus Semliki Forest, entre otros. Después el vector se introduce en las células en cultivo que permiten la replicación de alfavirus y en las que también se expresan las proteínas estructurales de alfavirus, de modo que el vector se empaqueta con las proteínas estructurales en ARPs que finalmente se liberan de la célula. Los métodos para la preparación de partículas de replicón de alfavirus adyuvantes infecciosas, deficientes de propagación, con altos rendimientos se describen en la patente de EE.UU. 7.018.218.

Como se usa en la presente memoria, la interleucina-12 es una proteína conocida en la técnica. Esta citocina es funcional en forma de un heterodímero que consiste en una subunidad p35 y una p40. Se sabe que IL-12 aumenta la secreción de IFN-gamma y la actividad citolítica de las células citolíticas naturales y los linfocitos T citotóxicos, y desempeña un papel clave en la generación de la respuesta inmune de tipo Th1. Deseablemente, la secuencia de una IL-12 usada en las ARPs que expresan IL-12 tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la de las especies en las que se administra la composición inmunogénica adyuvada con ARP de IL-12.

Los expertos en la técnica reconocen que las secuencias codificantes pueden variar debido a la degeneración del código genético y al uso de codones. Todas las secuencias sinónimas que codifican el antígeno u otro polipéptido o proteína de interés están incluidas dentro del alcance de esta solicitud.

Además, los expertos en la técnica reconocen que pueden producirse variaciones alélicas en las secuencias codificantes que no cambian significativamente la actividad de las secuencias de aminoácidos de los péptidos que esas secuencias codifican. Todas esas secuencias de ADN equivalentes están incluidas dentro del alcance de esta solicitud.

Las técnicas habituales para la clonación, aislamiento de ADN, amplificación y purificación, para reacciones enzimáticas que involucran ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diversas técnicas de separación son las conocidas y comúnmente empleadas por los expertos en la técnica. Se describe una serie de técnicas estándar en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Wu (ed.) (1993) Meth. Enzymol 218, parte I; Wu (ed.) (1979) Meth. Enzymol. 68; Wu et al. (eds.) (1983) Meth. Enzymol. 100 y 101; Grossman y Moldave (eds.) Meth. Enzymol. 65; Miller (ed.) (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Old y Primrose (1981) Principles of Gene Manipulation, University of California Press, Berkeley; Schleif y Wensink (1982) Practical Methods in Molecular Biology; Glover (ed.) (1985) DNA Cloning Vol. I y II, IRL Press, Oxford, R.U.; Hames y Higgins (eds.) (1985) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, R.U.; Setlow y Hollaender (1979) Genetic Engineering: Principles and Methods, Vols. 1-4, Plenum Press, Nueva York; y Ausubel et al. (1992) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, Nueva York, NY. Las abreviaturas y la nomenclatura, cuando se emplean, se consideran habituales en el campo, y se usan comúnmente en revistas profesionales como las citadas en la presente memoria.

Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunogénicas, como se proporcionan en la presente memoria, comprenden una cantidad inmunogénica de las partículas de replicón de alfavirus deficientes de propagación infecciosas o partículas vivas atenuadas en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de partículas infecciosas de alfavirus que es suficiente para provocar una respuesta inmune en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. Se considera adecuada una cantidad de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9, especialmente 10^6 a 10^8, unidades infecciosas o ARP por dosis, dependiendo de la edad y la especie del sujeto a tratar. Los portadores ejemplares farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua estéril apirógena y solución salina fisiológica estéril apirógena. Los

sujetos, a los que se pueden administrar cantidades inmunogénicas de las partículas infecciosas de alfavirus deficientes de replicación incluyen sujetos humanos y animales (por ejemplo, perros, gatos, vacas, caballos, burros, ratones, hámsters, monos, cobayas, pájaros, huevos). La administración puede ser por cualquier medio adecuado, como la administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarrectal, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden las ARPs (que dirigen la expresión de la secuencia o secuencias de interés cuando las composiciones se administran a un ser humano o animal) pueden formularse mediante cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Dichas composiciones, especialmente las vacunas, se preparan típicamente como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en un líquido antes de la inyección. Las preparaciones liofilizadas también son adecuadas.

Los ingredientes inmunogénicos activos (las ARPs) a menudo se mezclan con excipientes o vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos, así como estabilizantes, por ejemplo, HSA u otras proteínas adecuadas y azúcares reductores.

Además, si se desea, las vacunas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y / o adyuvantes que mejoran la efectividad de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero sin limitación: hidróxido de aluminio; N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominada nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2- (1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominada MTP-PE); y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno / Tween 80 al 2%. La efectividad de un adyuvante puede determinarse midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el producto inmunogénico del ARP resultante de la administración del inmunógeno en vacunas que también están compuestas por los diversos adyuvantes. También se pueden usar formulaciones y modos de administración adicionales como se conocen en la técnica.

Las composiciones que contienen ARP inmunogénicas (o de otro modo biológicamente activas) se administran de manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea profiláctica y / o terapéuticamente efectiva. La cantidad a administrar, que generalmente está en el rango de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 unidades infecciosas por ml en una dosis, depende del sujeto a tratar, la ruta por la cual se administran los ARPs, la inmunogenicidad del producto de expresión, los tipos de respuestas inmunes efectoras deseadas y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo que se requiere administrar pueden depender del juicio del médico, veterinario u otro profesional de la salud, y pueden ser particulares para cada individuo, pero tal determinación está dentro de la habilidad de dicho médico.

La vacuna u otra composición inmunogénica se puede administrar en una dosis única o en un calendario de dosis múltiples. Un calendario de dosis múltiples es aquel en el que un ciclo primario de vacunación puede incluir 1 a 10 o más dosis separadas, seguidas de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según sea necesario para mantener y / o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, semanalmente o de 1 a 4 meses para una segunda dosis y, si es necesario, una o más dosis posteriores después de varios meses / años.

Listado de secuencias

<110> AlphaVax, Inc.
Jonathan, Smith F.
Bolyn, Hubby
Peter, Berglund
Laura, Copp
Whitney, Ellis

<120> Partículas de replicón de alfavirus como adyuvantes inmunológicos

<130> 138-06WO

<140> sin asignar
<141> 12-09-2007

<150> US 60/825,394
<151> 12-09-2006

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como un cebador.

<400> 1
cggatatcat ggcctgtcct cagaagc 27

<210> 2
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como un cebador

<400> 2
cgggcgcgcc ttaggcggag ctcagatag 29

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como un cebador

<400> 3
tcggatccat ggcctgtcct cagaagc 27

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como un cebador

<400> 4
ccggatcctt aggcggagct cagatagc 28

<210> 5
<211> 1620
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: secuencia que codifica interleucina-12 murina.

<400> 5

```
atggcctgtc ctcagaagct aaccatctcc tggtttgcca tcgttttgct ggtgtctcca     60
ctcatggcca tgtgggagct ggagaaagac gtttatgttg tagaggtgga ctggactccc    120
gatgcccctg gagaaacagt gaacctcacc tgtgacacgc ctgaagaaga tgacatcacc    180
tggacctcag accagagaca tggagtcata ggctctggaa agaccctgac catcactgtc    240
aaagagtttc tagatgctgg ccagtacacc tgccacaaag gaggcgagac tctgagccac    300
tcacatctgc tgctccacaa gaaggaaaat ggaatttggt ccactgaaat tttaaaaaat    360
ttcaaaaaca agactttcct gaagtgtgaa gcaccaaatt actccggacg gttcacgtgc    420
tcatggctgg tgcaaagaaa catggacttg aagttcaaca tcaagagcag tagcagtccc    480
cccgactctc gggcagtgac atgtggaatg gcgtctctgt ctgcagagaa ggtcacactg    540
gaccaaaggg actatgagaa gtattcagtg tcctgccagg aggatgtcac ctgcccaact    600
gccgaggaga ccctgcccat tgaactggcg ttggaagcac ggcagcagaa taaatatgag    660
aactacagca ccagcttctt catcagggac atcatcaaac cagacccgcc caagaacttg    720
cagatgaagc ctttgaagaa ctcacaggtg gaggtcagct gggagtaccc tgactcctgg    780
agcactcccc attcctactt ctccctcaag ttctttgttc gaatccagcg caagaaagaa    840
aagatgaagg agacagagga ggggtgtaac cagaaaggtg cgttcctcgt agagaagaca    900
tctaccgaag tccaatgcaa aggcgggaat gtctgcgtgc aagctcagga tcgctattac    960
aattcctcat gcagcaagtg ggcatgtgtt ccctgcagag tccgatcggt tcctggagta   1020
ggggtacctg gagtgggcag ggtcataccg gtctctggac ctgccaggtg tcttagccag   1080
tcccgaaacc tgctgaagac cacagatgac atggtgaaga cggccagaga aaagctgaaa   1140
cattattcct gcactgctga agacatcgat catgaagaca tcacacggga ccaaaccagc   1200
acattgaaga cctgtttacc actggaacta cacaagaacg agagttgcct ggctactaga   1260
gagacttctt ccacaacaag agggagctgc ctgcccccac agaagacgtc tttgatgatg   1320
accctgtgcc ttggtagcat ctatgaggac ttgaagatgt accagacaga gttccaggcc   1380
```

atcaacgcag cacttcagaa tcacaaccat cagcagatca ttctagacaa gggcatgctg 1440

gtggccatcg atgagctgat gcagtctctg aatcataatg gcgagactct gcgccagaaa 1500

cctcctgtgg gagaagcaga cccttacaga gtgaaaatga agctctgcat cctgcttcac 1560

gccttcagca cccgcgtcgt gaccatcaac agggtgatgg gctatctgag ctccgcctaa 1620

REIVINDICACIONES

1. Partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso en un método para mejorar una respuesta inmune a un antígeno administrado a un sujeto, y el uso comprende administrar al sujeto, al mismo tiempo y en la misma localización, el antígeno y las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12, en donde las partículas de replicón de alfavirus derivan de las partículas de replicón del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV).

2. Partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso en un método para reducir el riesgo de contraer una enfermedad o reducir la gravedad de una enfermedad en un sujeto, y el uso comprende administrar, al mismo tiempo y en la misma localización, (a) un antígeno seleccionado del microorganismo o virus que causa la enfermedad, y (b) las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12, en donde las partículas de replicón de alfavirus son partículas de replicón del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV).

3. Las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso de la reivindicación 2, en donde la enfermedad es la gripe;

en donde, opcionalmente, el antígeno es al menos uno de hemaglutinina del virus de la gripe y neuraminidasa del virus de la gripe;

en donde, opcionalmente, el antígeno es una preparación de vacuna antigripal inactivada trivalente.

4. Una composición de vacuna que comprende

(a) una preparación de antígeno seleccionada del grupo que consiste en una proteína, glicoproteína, lipoproteína, el producto de expresión de un minigen cuyo producto comprende una cadena lineal de epítopos de interés, una toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, virus atenuado, virus inactivado, células bacterianas o parte(s) de las mismas, bacterias inactivadas, bacterias atenuadas, células fúngicas o parte(s) de las mismas, hongos atenuados, hongos inactivados, parásitos o parte(s) de los mismos, parásitos inactivados, parásitos atenuados, protozoos o parte(s) de los mismos, protozoos inactivados o parte(s) de los mismos, protozoos atenuados, ADN capaz de expresar un antígeno o fragmentos o epítopos del mismo, inmunógeno vectorizado con virus de viruela, vectorizado con alfavirus o un inmunógeno vectorizado con adenovirus, antígeno o tejido de células tumorales o una porción del mismo, polisacárido, lipopolisacárido o lipooligosacárido; y

(b) partículas de replicón de alfavirus que expresan interleucina-12, en donde las partículas de replicón de alfavirus son partículas de replicón del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV).

5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en donde la preparación de antígeno es una proteína; o

en donde la preparación de antígeno es partículas de replicón de alfavirus que expresan la proteína.

6. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en donde el antígeno es al menos uno de hemaglutinina del virus de la gripe y neuraminidasa del virus de la gripe; o

en donde el antígeno es una preparación de vacuna antigripal inactivada trivalente.

7. Partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso en un método de inmunización de un sujeto, que comprende administrar una única dosis de la composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

8. Las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno se selecciona del grupo que consiste en una proteína, glicoproteína, lipoproteína, el producto de expresión de un minigen cuyo producto comprende una cadena lineal de epítopos de interés, una toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, virus atenuado, virus inactivado, células bacterianas o parte(s) de las mismas, bacterias inactivadas, bacterias atenuadas, células fúngicas o parte(s) de las mismas, hongos atenuados, hongos inactivados, parásitos o parte(s) de los mismos, parásitos inactivados, parásitos atenuados, protozoos o parte(s) de los mismos, protozoos inactivados o parte(s) de los mismos, protozoos atenuados, ADN capaz de expresar un antígeno o fragmentos o epítopos del mismo, inmunógeno vectorizado con virus de viruela, vectorizado con alfavirus o un inmunógeno vectorizado con adenovirus, antígeno o tejido de células tumorales o una porción del mismo, polisacárido, lipopolisacárido o lipooligosacárido.

9. Las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso de la reivindicación 8, en donde el antígeno es una proteína.

10. Las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso de la reivindicación 8, en donde la dosis efectiva del antígeno es al menos cinco veces menor que la dosis del antígeno requerida en ausencia de partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para proporcionar una inmunización efectiva contra el antígeno.

11. Las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones

1 a 3 y 7 a 10, en donde el antígeno se expresa a partir de una partícula de replicón de EEV y en donde la dosis de las partículas de replicón de EEV que expresan el antígeno es igual o mayor que la dosis de partículas de replicón de EEV que expresan IL-12.

12. Las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 11, que comprende además administrar posteriormente una segunda dosis del antígeno en ausencia de las partículas de replicón de alfavirus que expresan IL-12;

en el que, opcionalmente, la segunda dosis del antígeno tiene una modalidad seleccionada del grupo que consiste en proteína, virus inactivado, ADN, antígenos vectorizados virales y partículas similares a virus que expresan el antígeno.

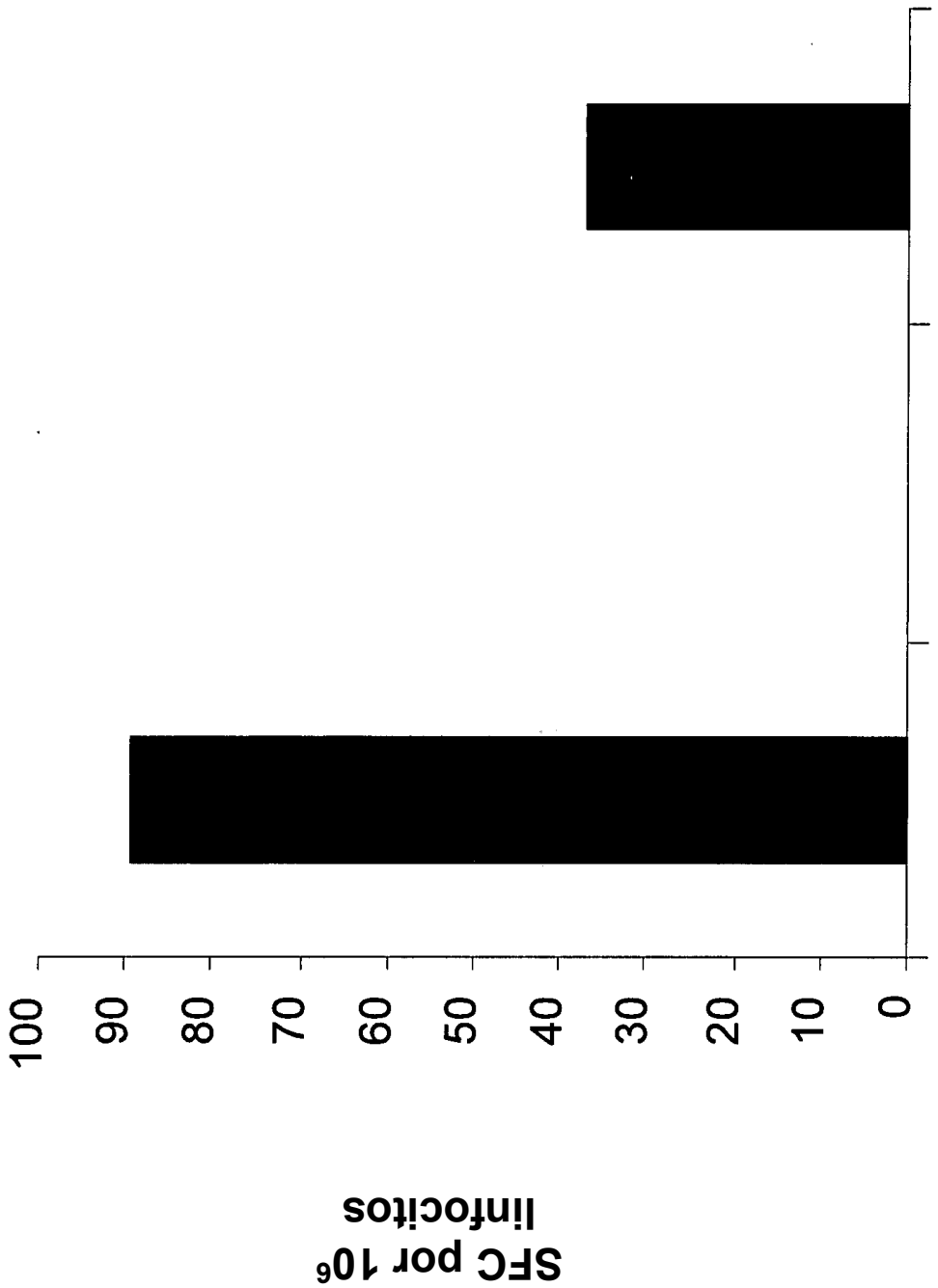

Fig. 1A

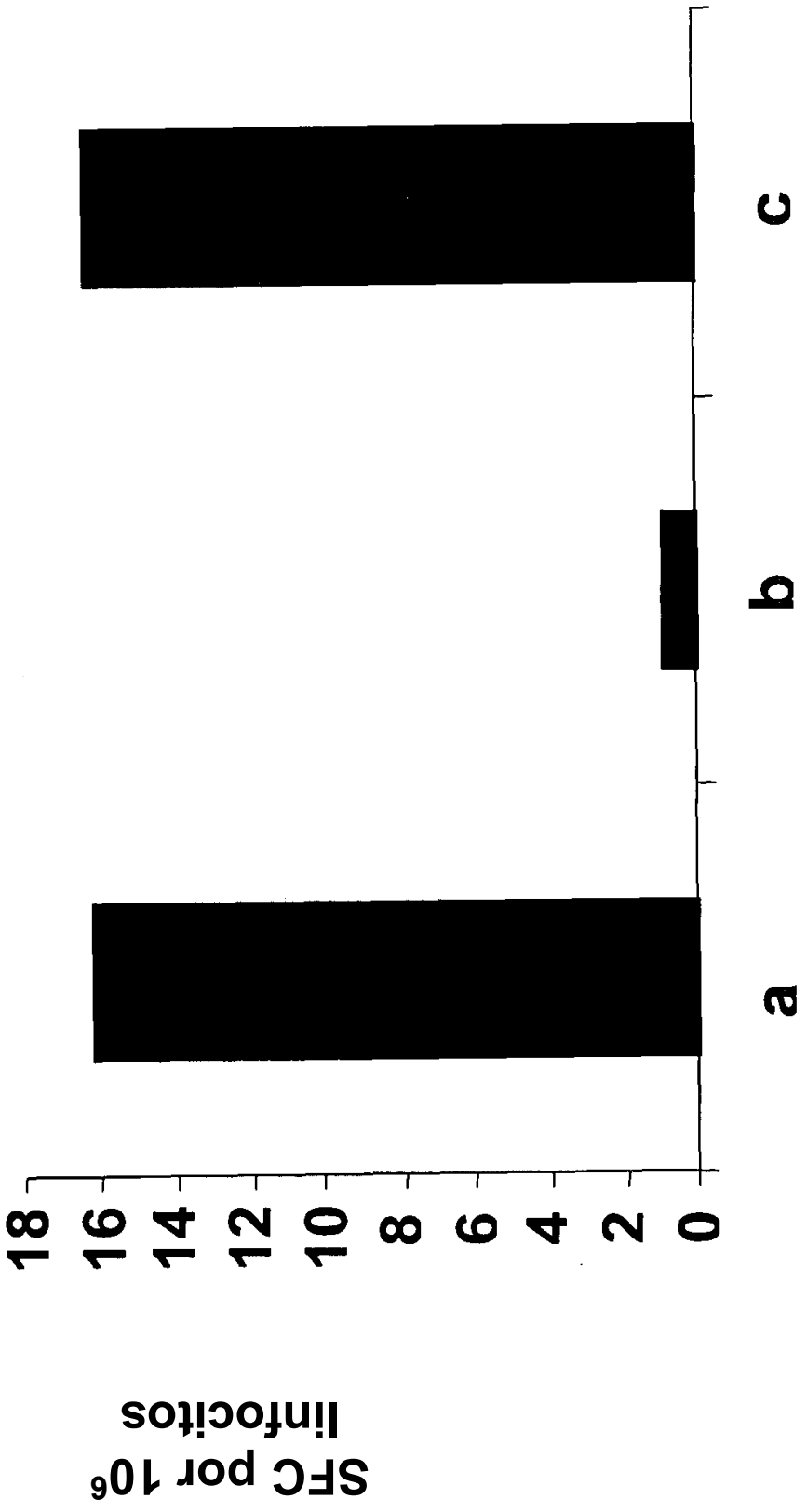

Fig. 1B

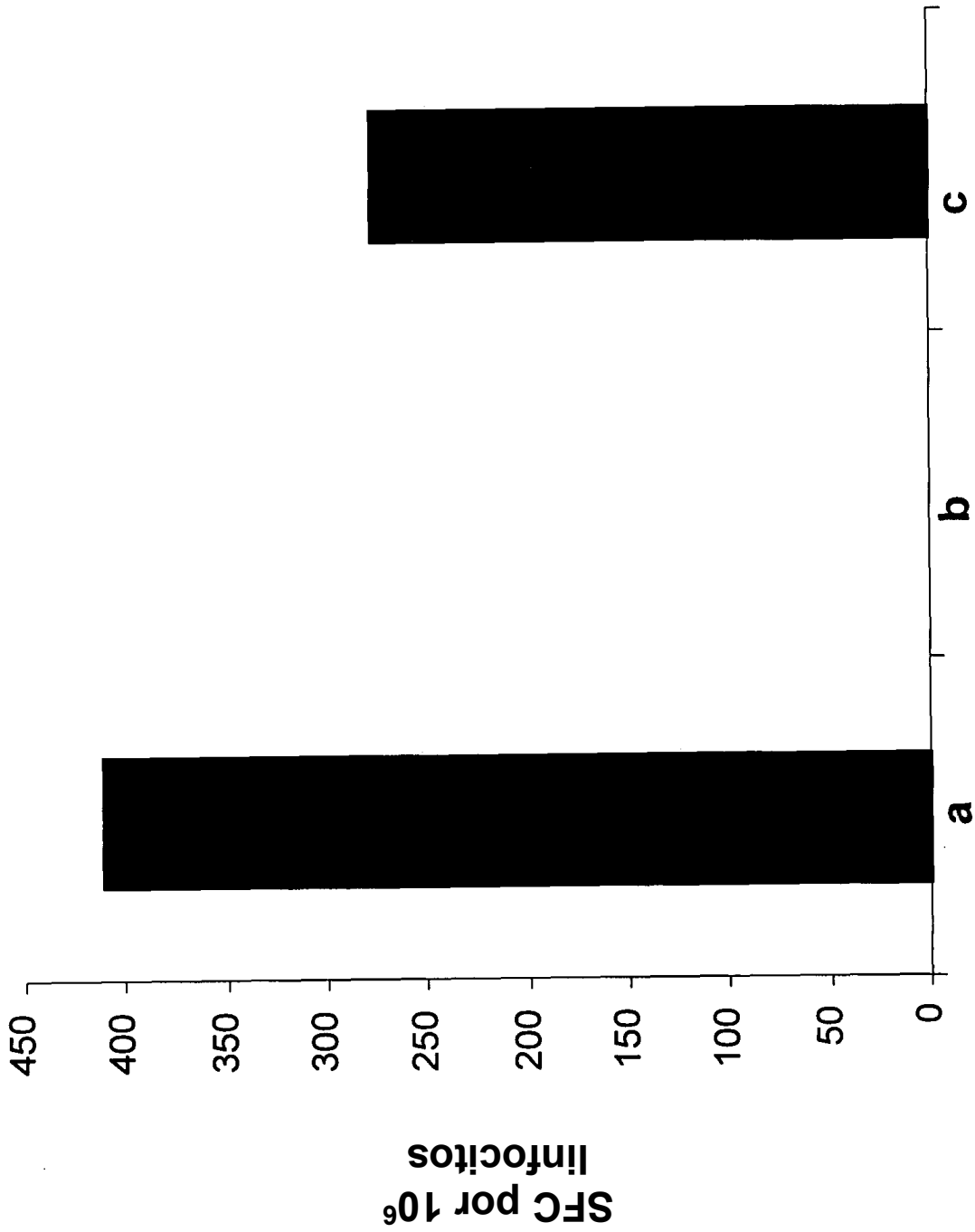

Fig. 1C

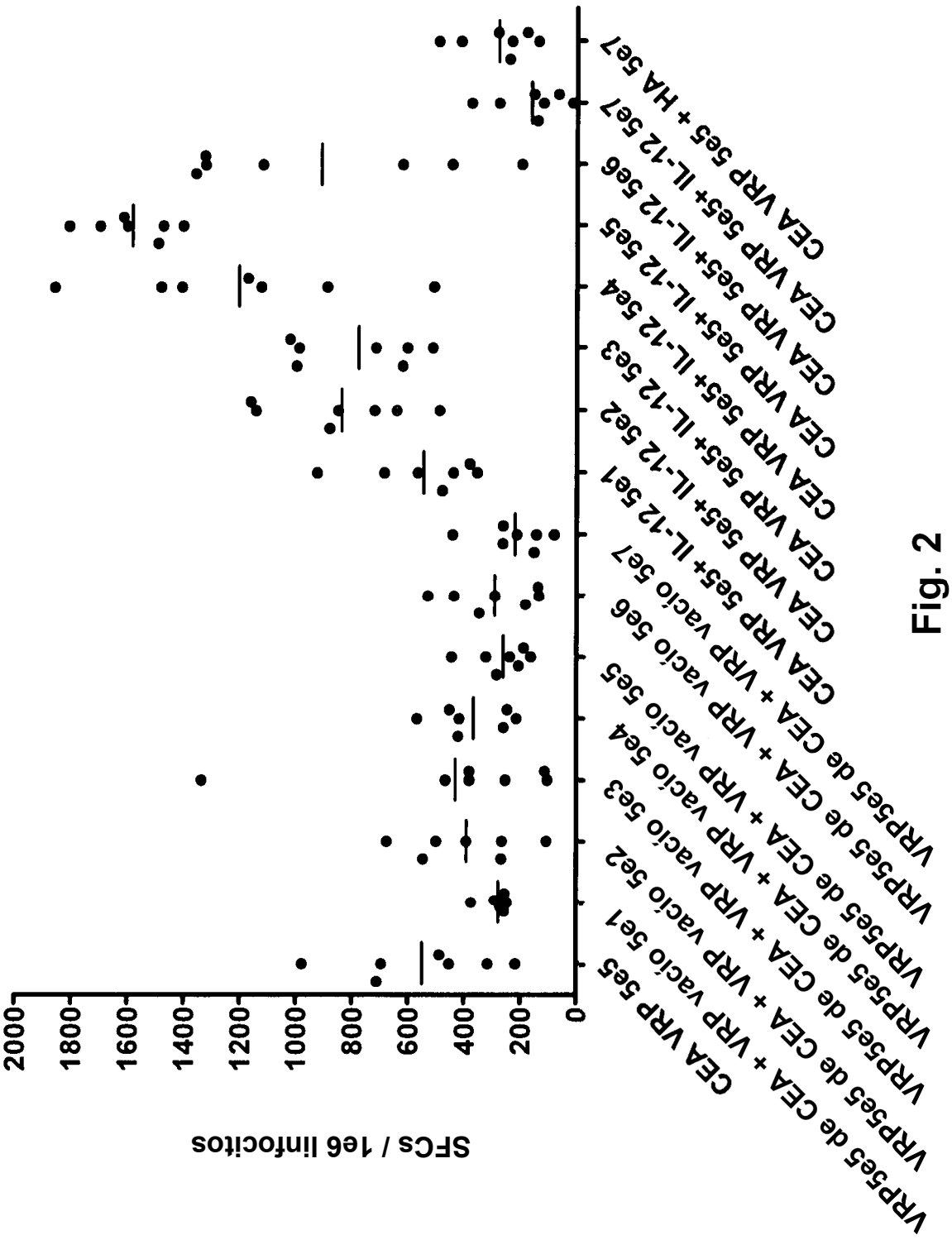
SFCs / 1e6 linfocitos
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
CEA VRP 5e5
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e1
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e2
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e3
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e4
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e5
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e6
VRP5e5 de CEA + VRP vacío 5e7
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e1
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e2
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e3
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e4
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e5
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e6
CEA VRP 5e5+ IL-12 5e7
CEA VRP 5e5 + HA 5e7

Fig. 2

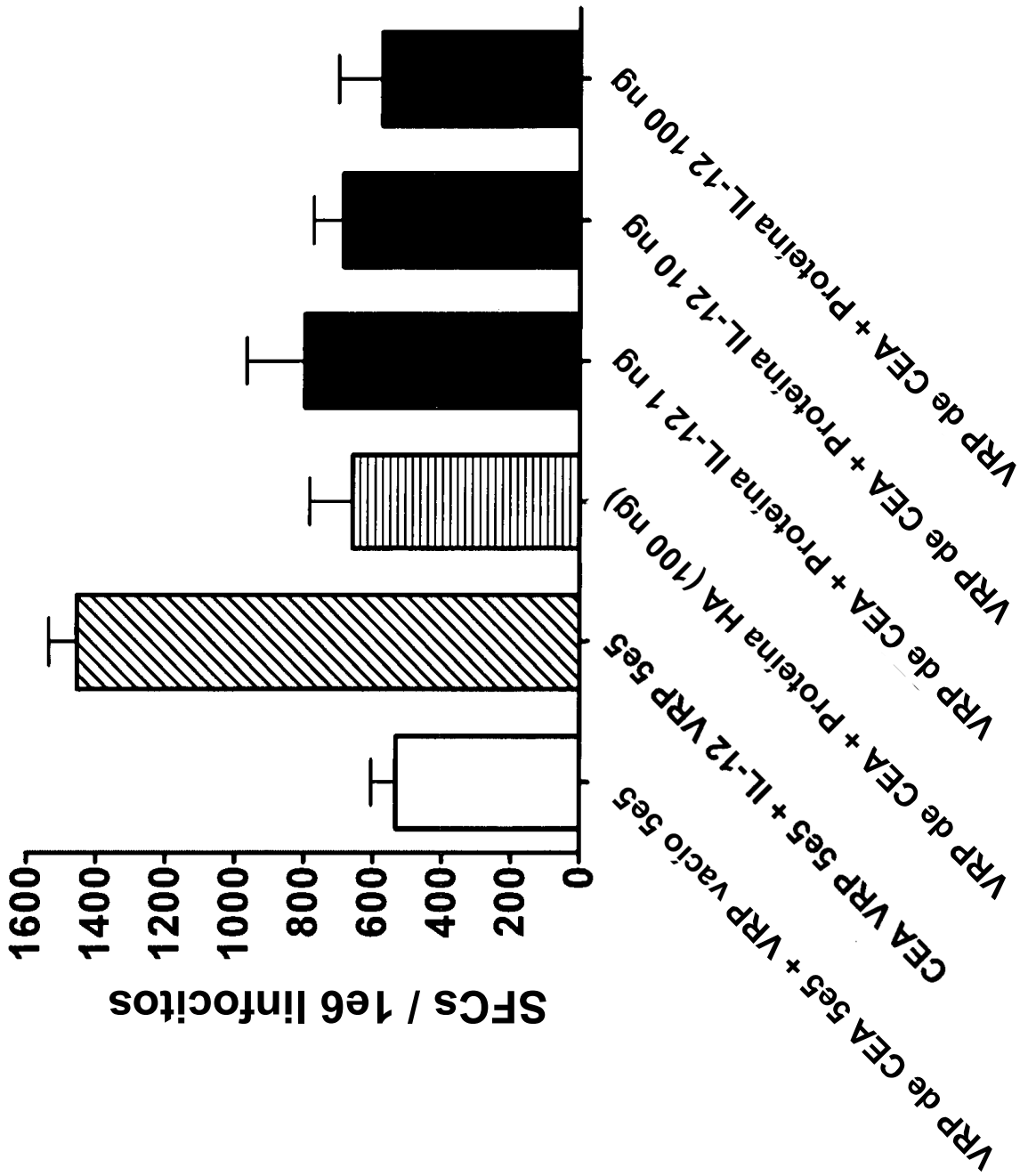
SFCs / 1e6 linfocitos
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
VRP de CEA 5e5 + VRP vacío 5e5
CEA VRP 5e5 + IL-12 VRP 5e5
VRP de CEA + Proteína HA (100 ng)
VRP de CEA + Proteína IL-12 1 ng
VRP de CEA + Proteína IL-12 10 ng
VRP de CEA + Proteína IL-12 100 ng

Fig. 3

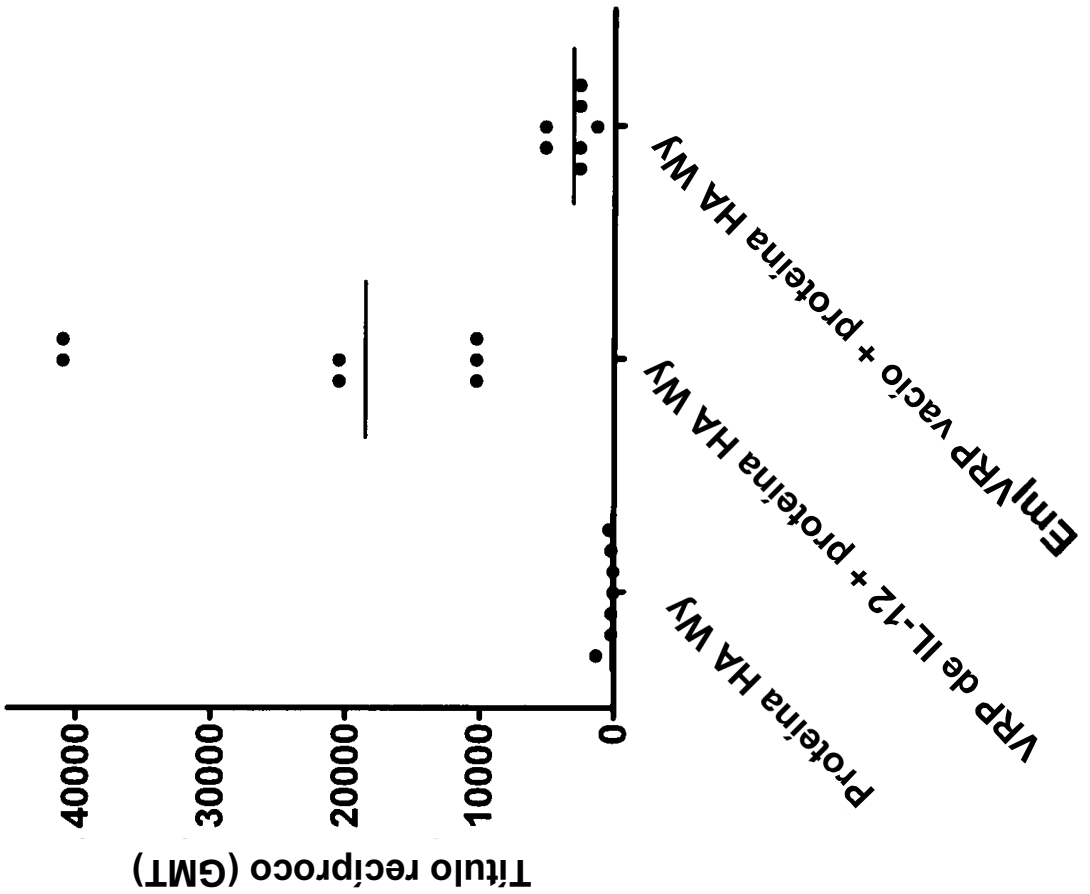
Título recíproco (GMT)
40000
30000
20000
10000
0
Proteína HA Wy
VRP de IL-12 + proteína HA Wy
EmlVRP vacío + proteína HA Wy

Fig. 4A

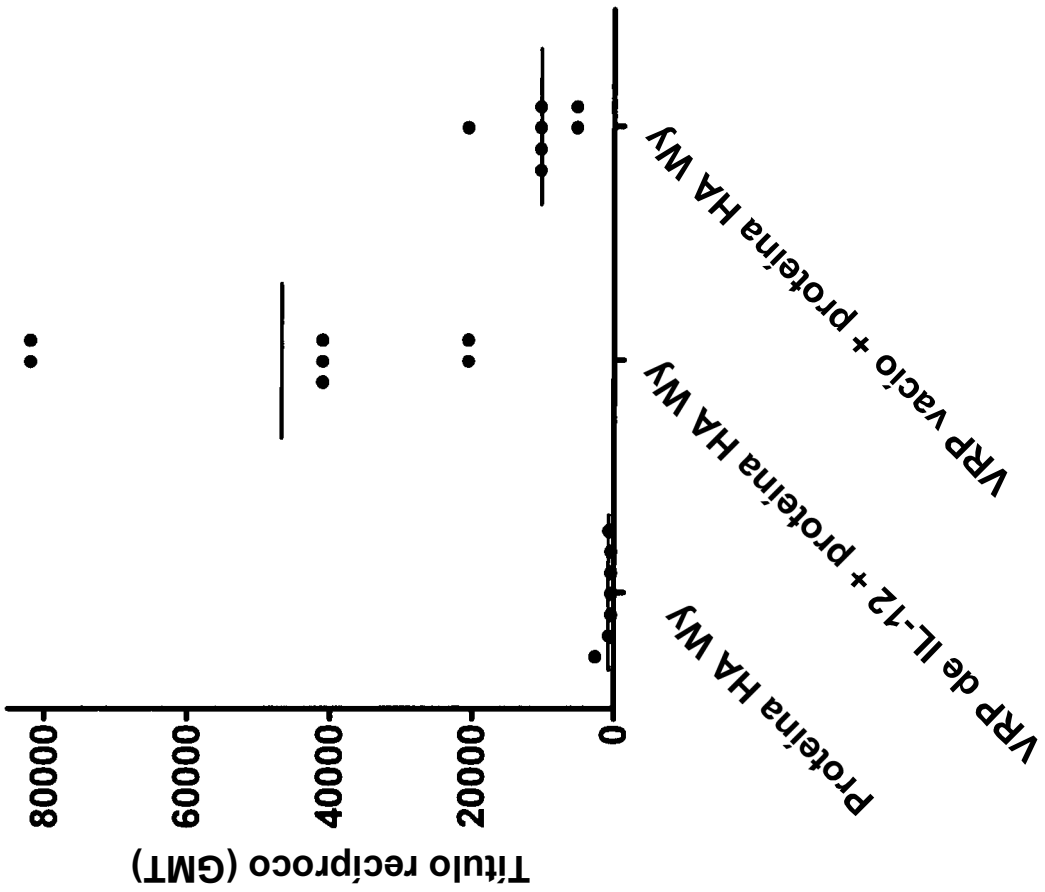
Título recíproco (GMT)
80000
60000
40000
20000
0
Proteína HA Wy
VRP de IL-12 + proteína HA Wy
VRP vacío + proteína HA Wy

Fig. 4B

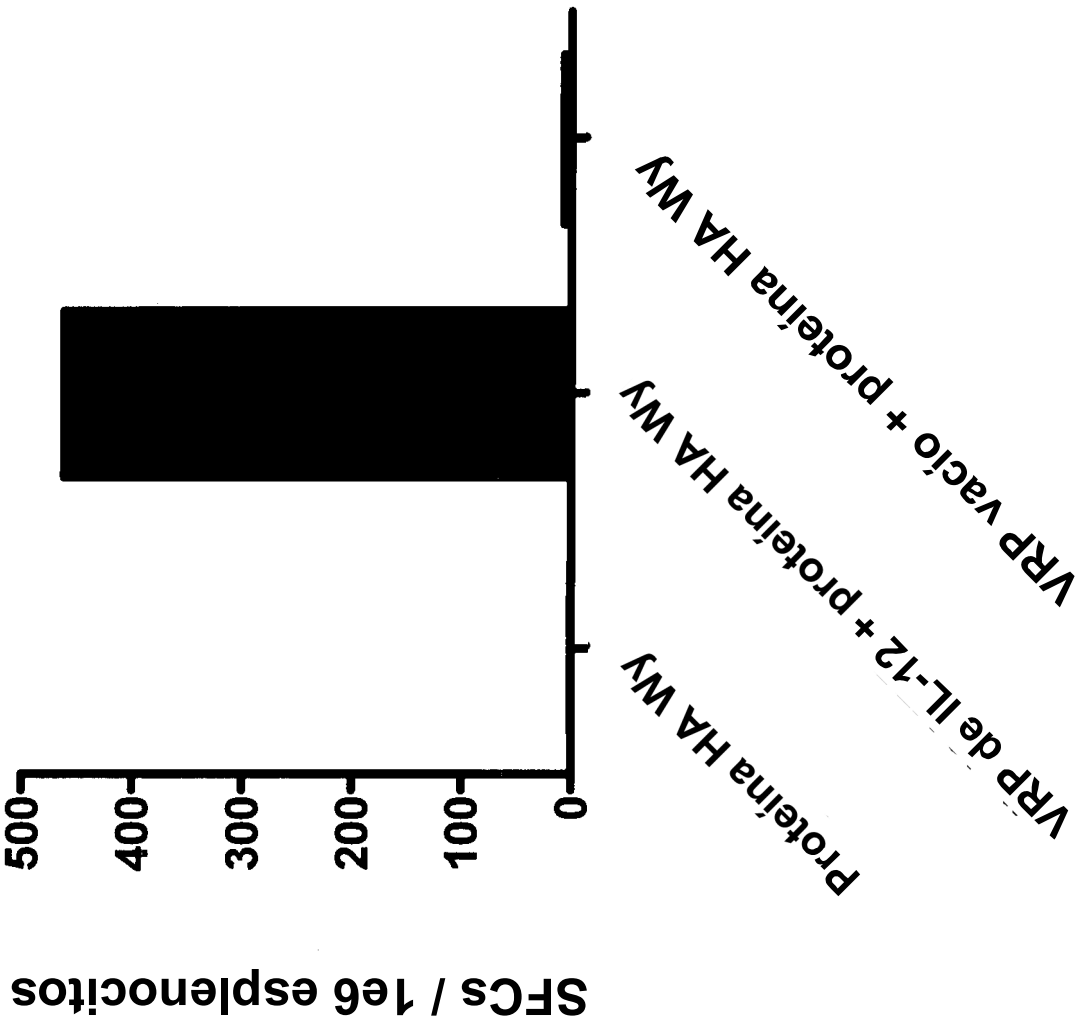
SFCs / 1e6 esplenocitos
500
400
300
200
100
0
Proteína HA WJ
VRP de IL-12 + proteína HA WJ
VRP vacío + proteína HA WJ

Fig. 4C

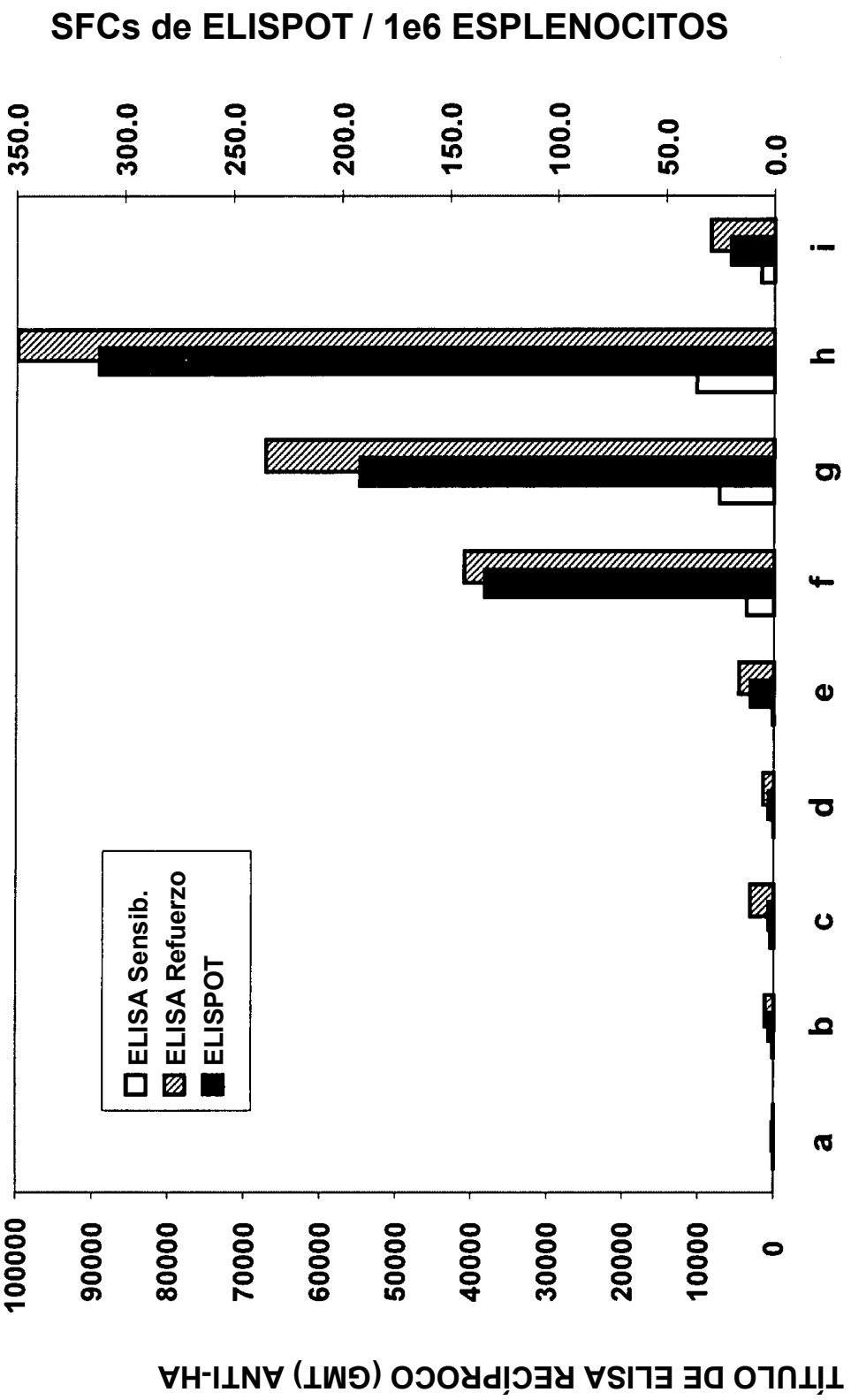
SFCs de ELISPOT / 1e6 ESPLENOCITOS
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
ELISA Sensib.
ELISA Refuerzo
ELISPOT
a
b
c
d
e
f
g
h
i
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
TÍTULO DE ELISA RECÍPROCO (GMT) ANTI-HA

Fig. 5

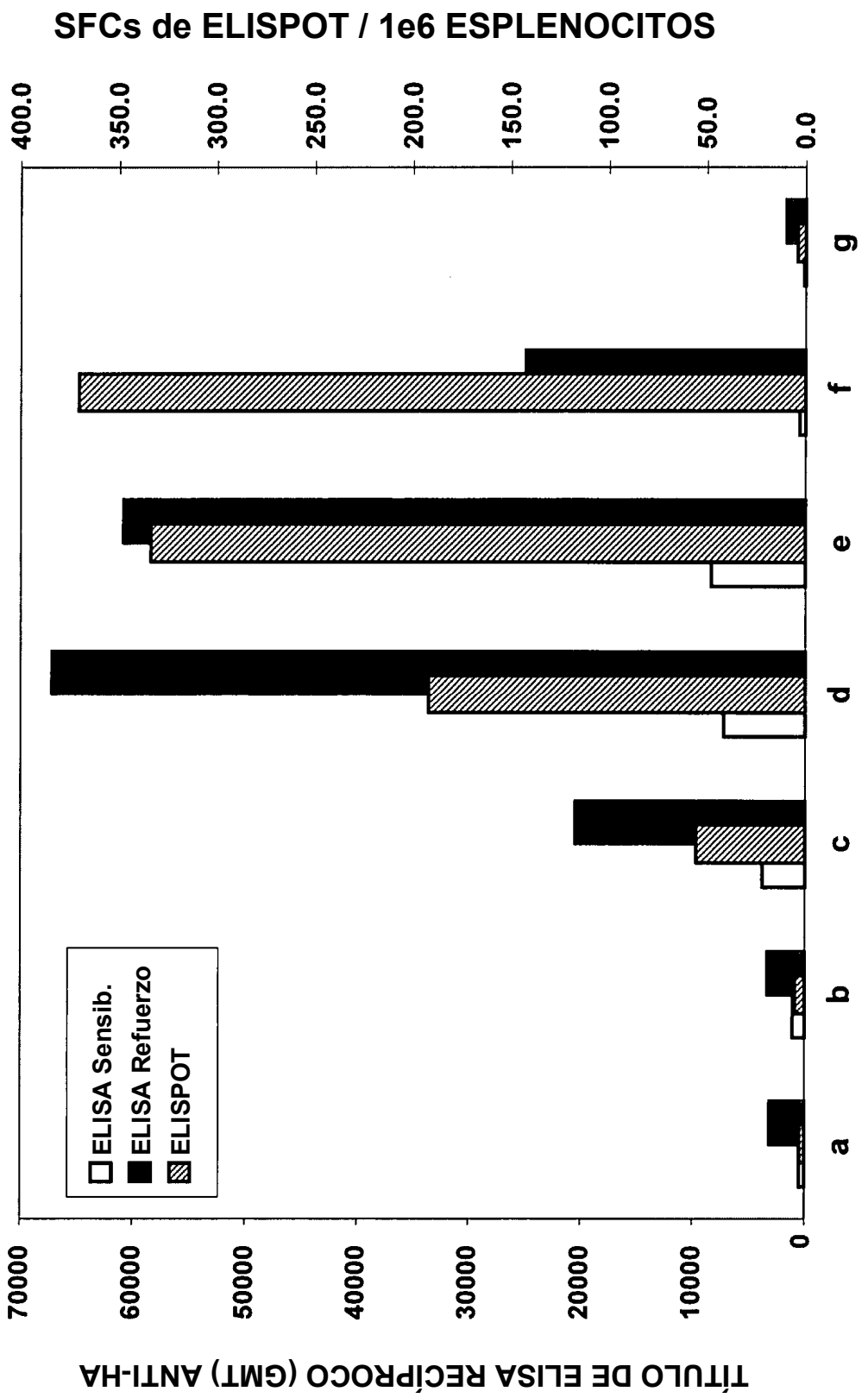
SFCs de ELISPOT / 1e6 ESPLENOCITOS
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
a
b
c
d
e
f
g
ELISA Sensib.
ELISA Refuerzo
ELISPOT
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
TÍTULO DE ELISA RECÍPROCO (GMT) ANTI-HA

Fig. 6

Fig. 7

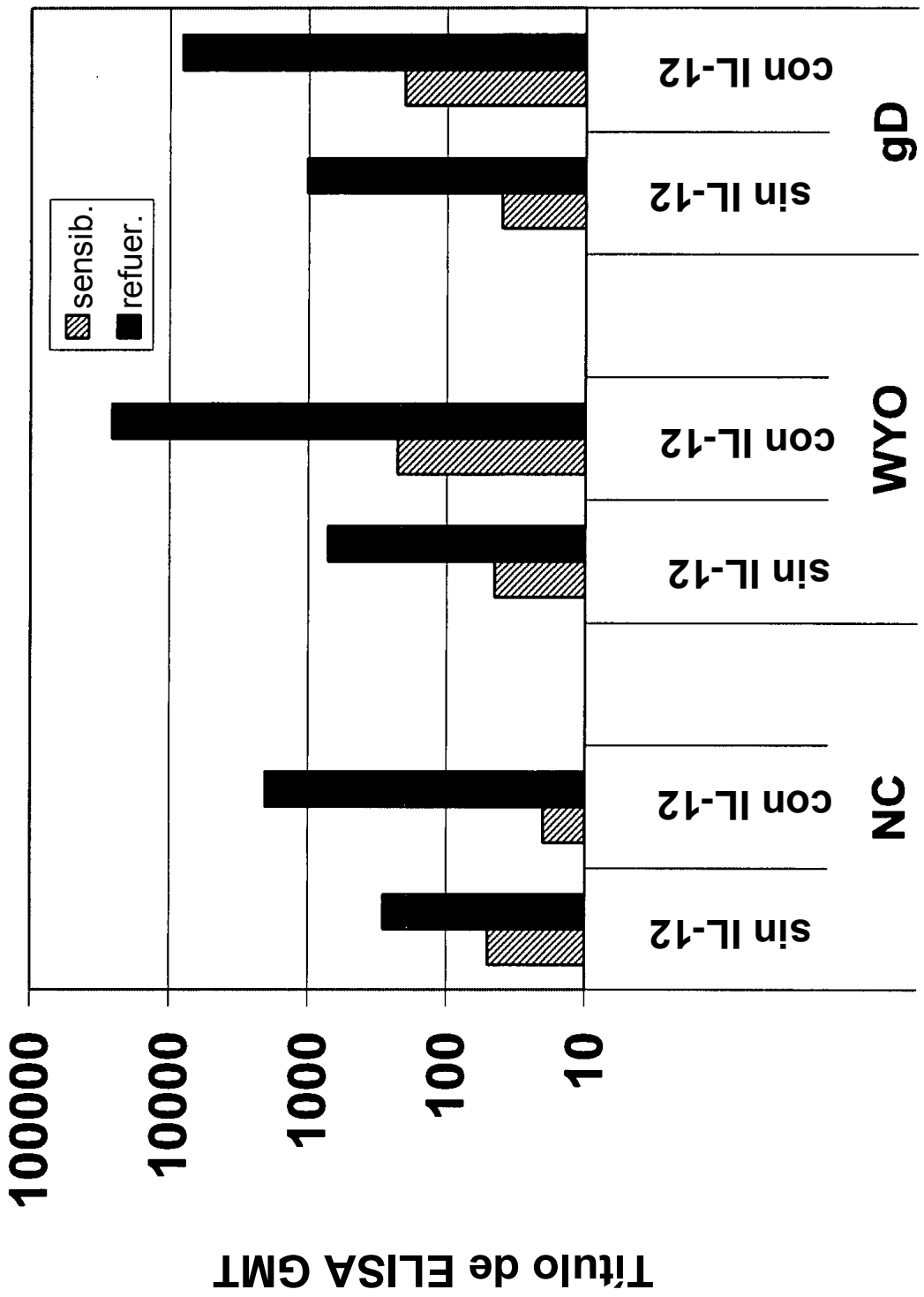
Título de ELISA GMT
100000
10000
1000
100
10
sensib.
refuer.
sin IL-12
con IL-12
NC
sin IL-12
con IL-12
WYO
sin IL-12
con IL-12
gD

Fig. 8

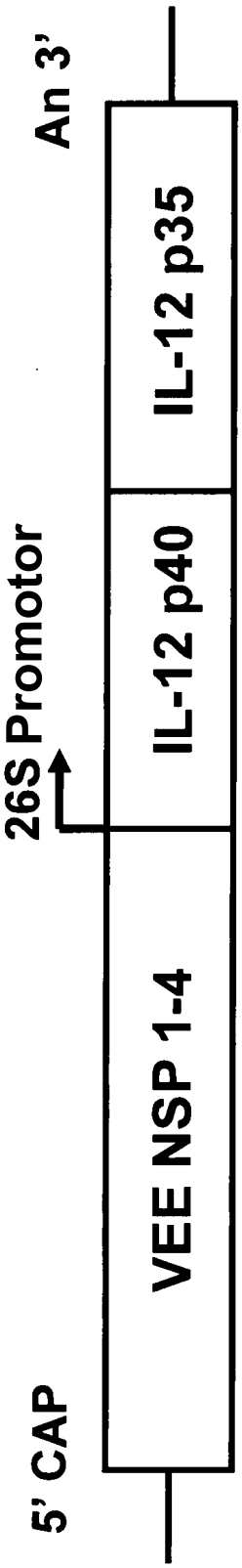

Fig. 9A

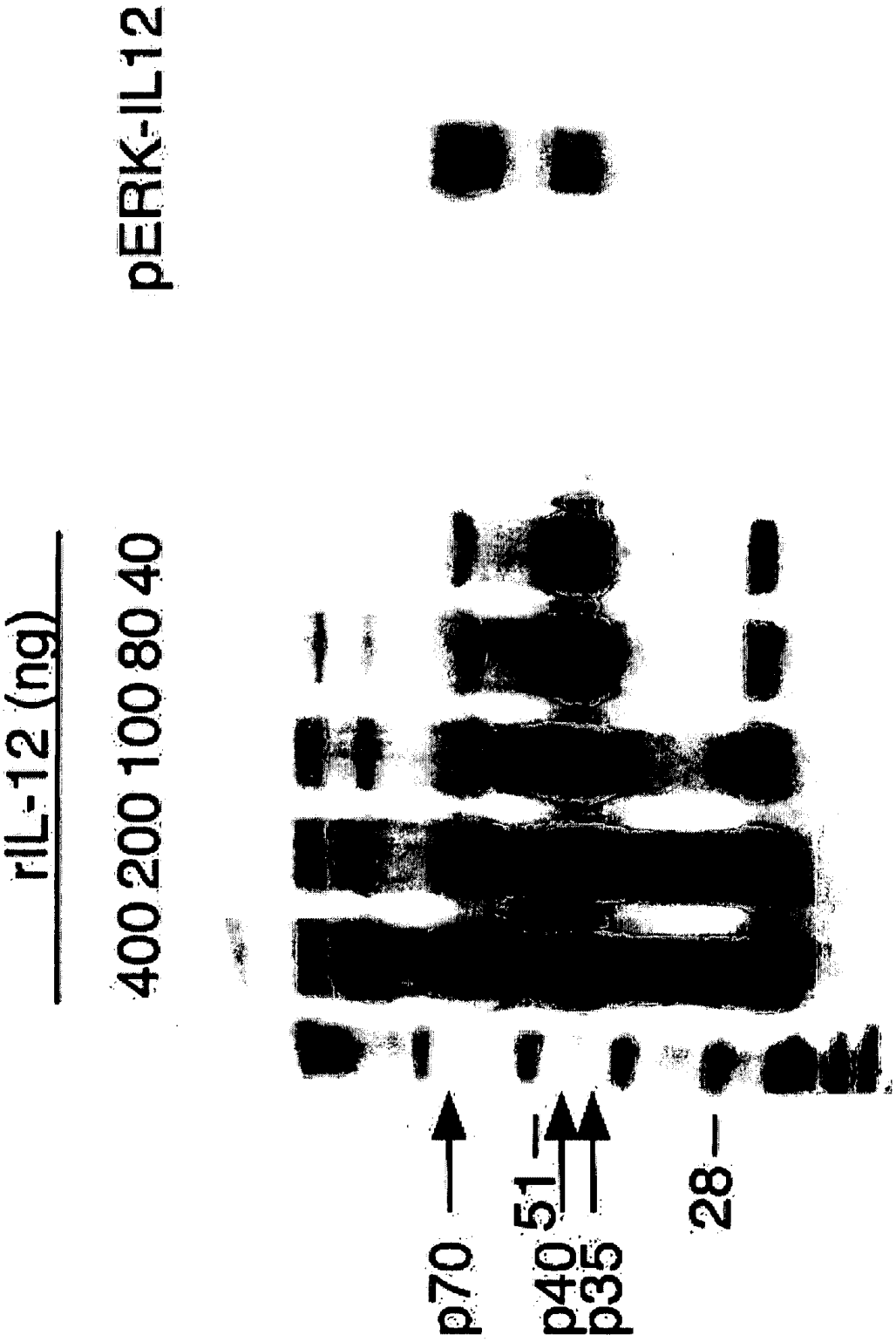

Fig. 9B

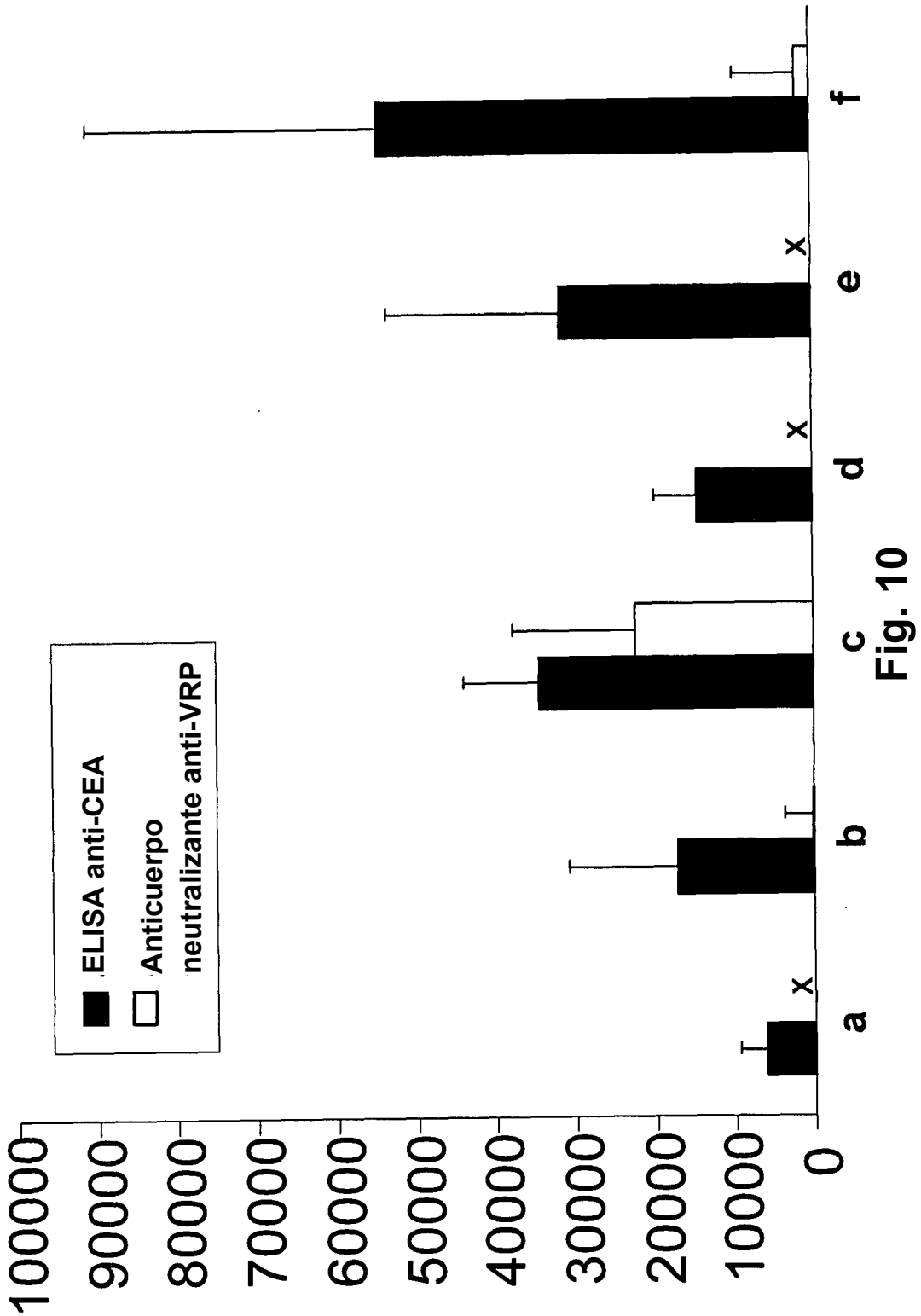
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
ELISA anti-CEA
Anticuerpo neutralizante anti-VRP
a
x
b
c
d
x
e
x
f

Fig. 10

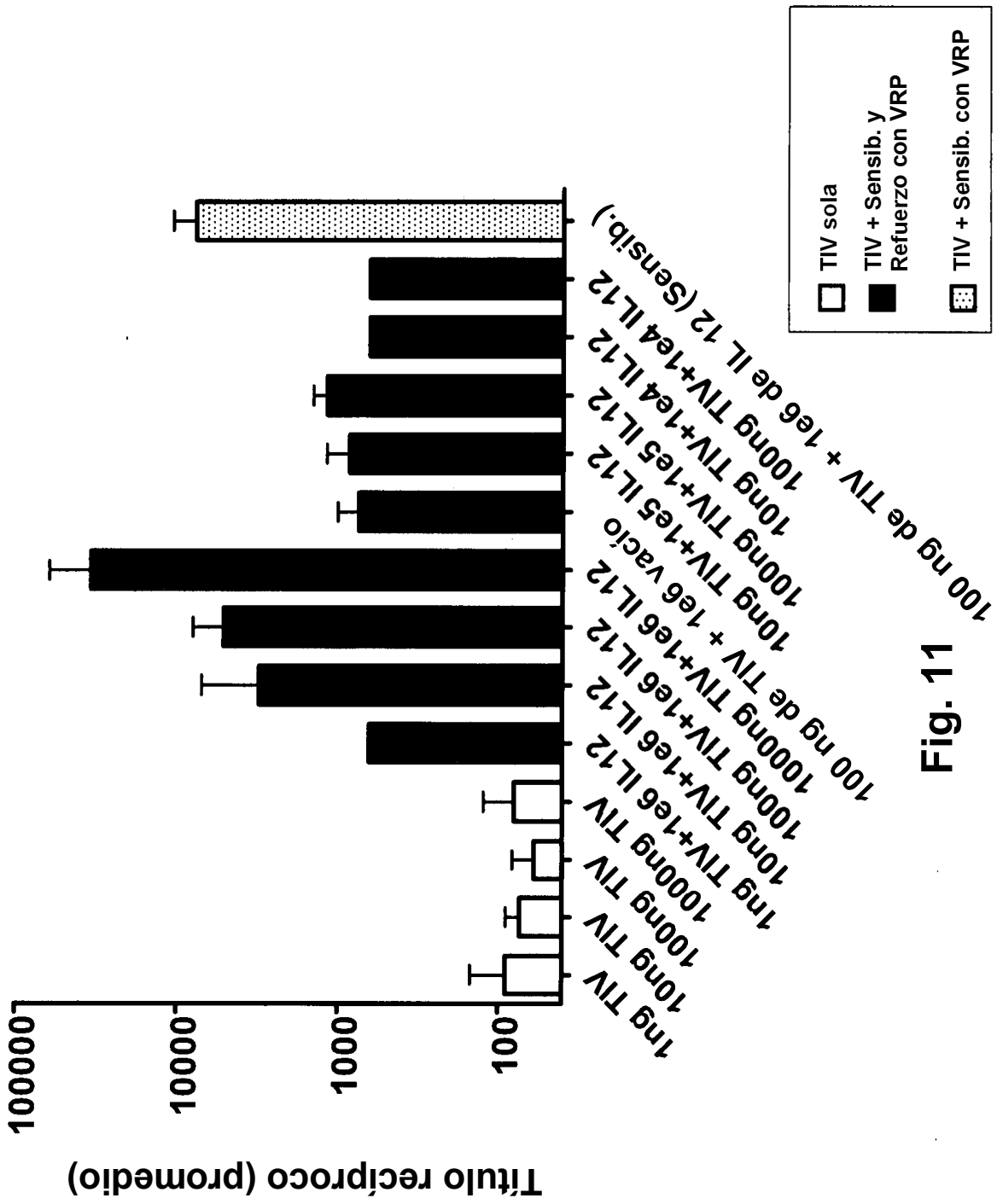
TIV sola
TIV + Sensib. y Refuerzo con VRP
TIV + Sensib. con VRP
Título recíproco (promedio)
100000
10000
1000
100
1ng TIV
10ng TIV
100ng TIV
1000ng TIV
1ng TIV+1e6 IL12
10ng TIV+1e6 IL12
100ng TIV+1e6 IL12
1000ng TIV+1e6 IL12
100 ng de TIV + 1e6 vacío
10ng TIV+1e5 IL12
100ng TIV+1e5 IL12
10ng TIV+1e4 IL12
100ng TIV+1e4 IL12
100 ng de TIV + 1e6 de IL 12 (Sensib.)

Fig. 11

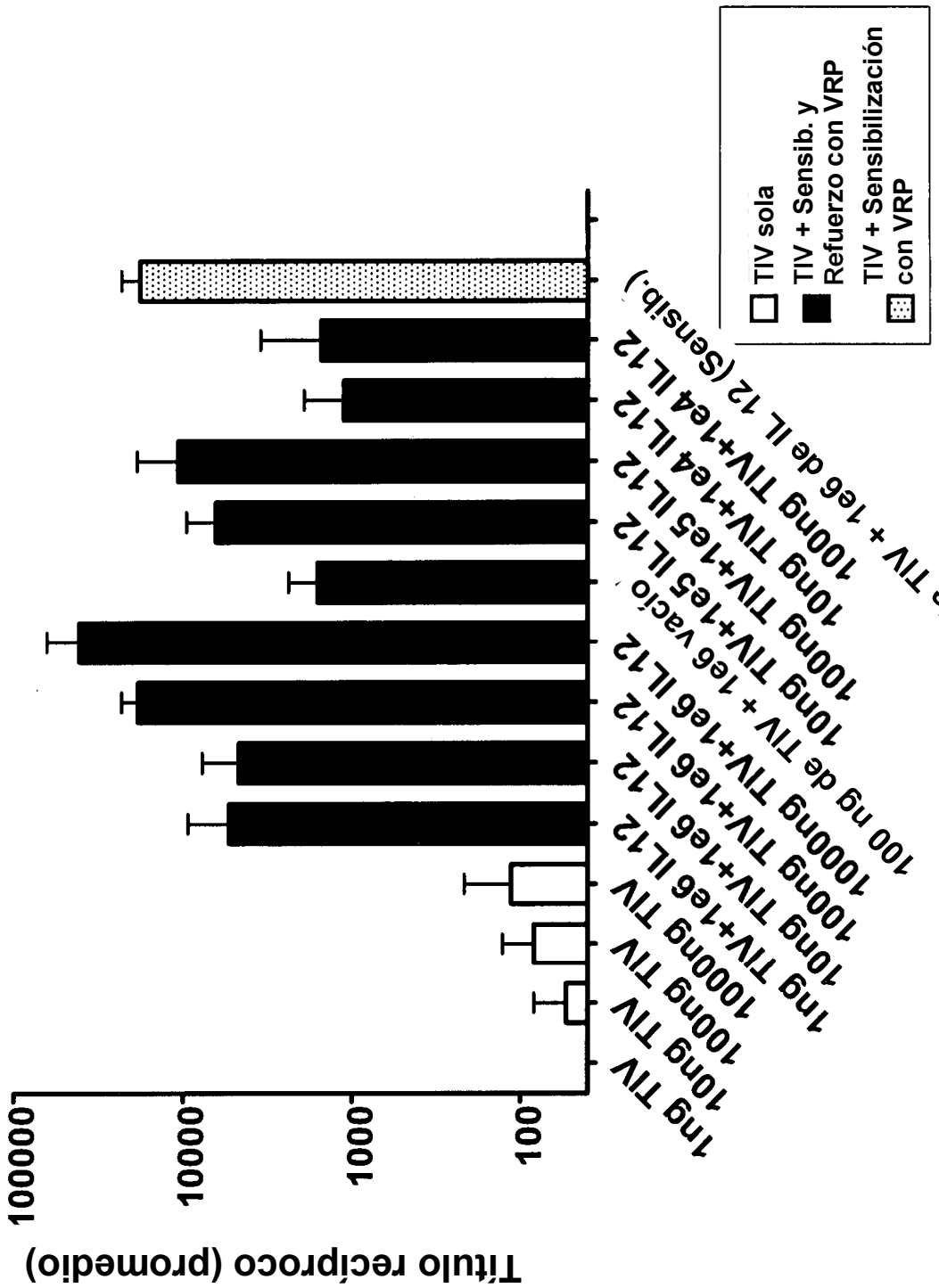
Título recíproco (promedio)
100000
10000
1000
100
1ng TIV
10ng TIV
100ng TIV
1000ng TIV
1ng TIV+1e6 IL12
10ng TIV+1e6 IL12
100ng TIV+1e6 IL12
1000ng TIV+1e6 IL12
100 ng de TIV + 1e6 vacío
10ng TIV+1e5 IL12
100ng TIV+1e5 IL12
10ng TIV+1e4 IL12
100ng TIV+1e4 IL12
100 ng de TIV + 1e6 de IL 12 (Sensib.)
TIV sola
TIV + Sensib. y Refuerzo con VRP
TIV + Sensibilización con VRP

Fig. 12

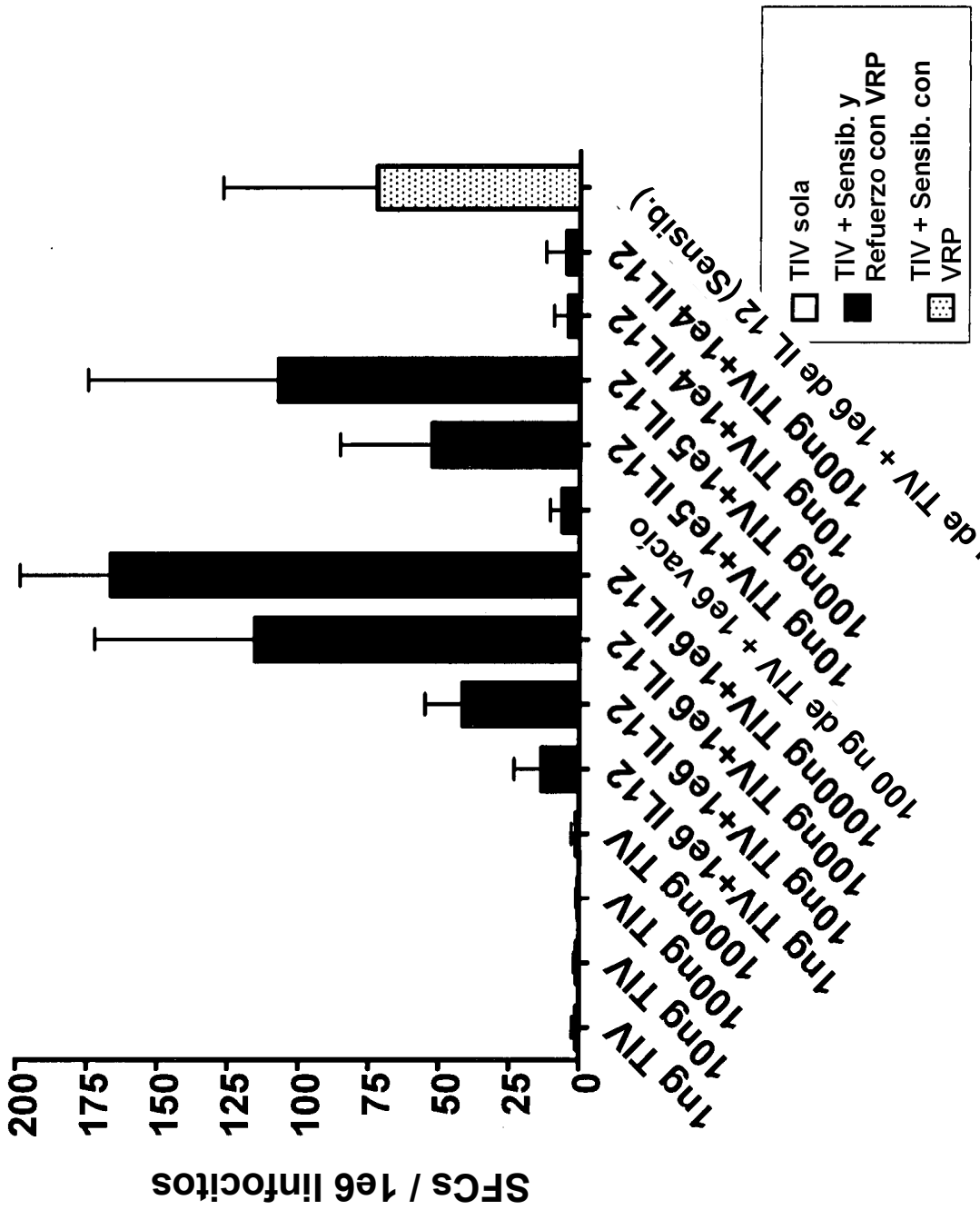
SFCs / 1e6 linfocitos
200
175
150
125
100
75
50
25
0
1ng TIV
10ng TIV
100ng TIV
1000ng TIV
1ng TIV+1e6 IL12
10ng TIV+1e6 IL12
100ng TIV+1e6 IL12
1000ng TIV+1e6 IL12
100 ng de TIV + 1e6 vacío
10ng TIV+1e5 IL12
100ng TIV+1e5 IL12
10ng TIV+1e4 IL12
100ng TIV+1e4 IL12
100 ng de TIV + 1e6 de IL 12 (Sensib.)
TIV sola
TIV + Sensib. y Refuerzo con VRP
TIV + Sensib. con VRP

Fig. 13

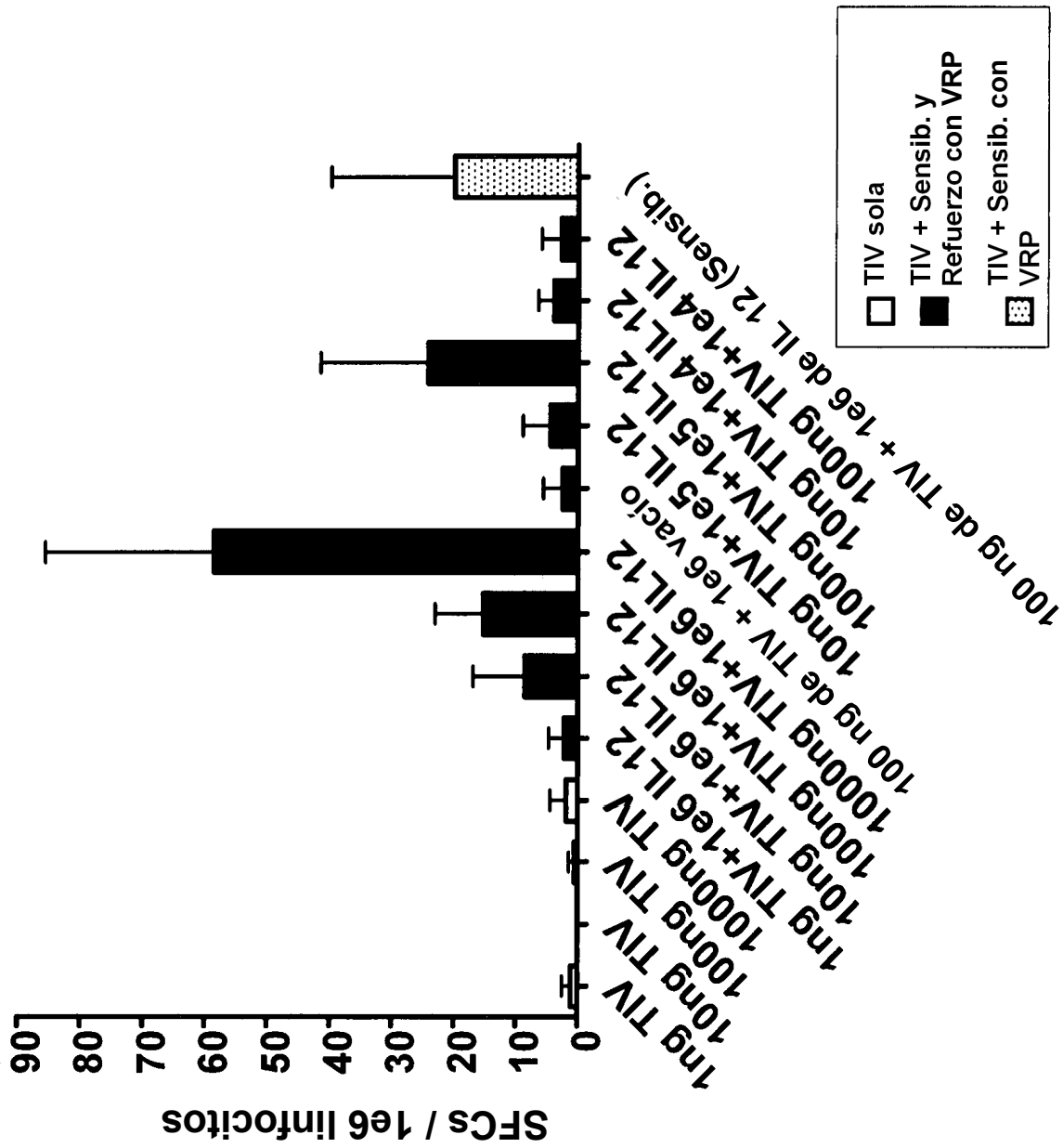
SFCs / 1e6 linfocitos
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
1ng TIV
10ng TIV
100ng TIV
1000ng TIV
1ng TIV+1e6 IL 12
10ng TIV+1e6 IL 12
100ng TIV+1e6 IL 12
1000ng TIV+1e6 IL 12
100 ng de TIV + 1e6 vacío
10ng TIV+1e5 IL 12
100ng TIV+1e5 IL 12
10ng TIV+1e4 IL 12
100ng TIV+1e4 IL 12
100 ng de TIV + 1e6 de IL 12 (Sensib.)
TIV sola
TIV + Sensib. y Refuerzo con VRP
TIV + Sensib. con VRP

Fig. 14