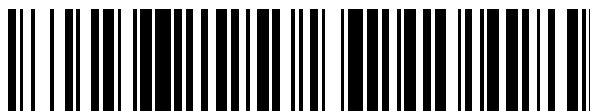


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 713**

51 Int. Cl.:

A61P 31/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2012** **PCT/US2012/046318**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013** **WO13055418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2012** **E 12839761 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019** **EP 2731628**

54 Título: **Vacuna de ADN contra el virus de Lassa**

30 Prioridad:

11.07.2011 US 201161506579 P
12.07.2011 US 201161507062 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
06.05.2020

73 Titular/es:

INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
660 W. Germantown Pike, Suite 110
Plymouth Meeting, PA 19462, US

72 Inventor/es:

SCHMALJOHN, CONNIE;
BRODERICK, KATE;
SARDESAI, NIRANJAN y
CASHMAN, KATHLEEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 758 713 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna de ADN contra el virus de Lassa

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a vacunas a base de ADN eficaces en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora contra los arenavirus, y a métodos de preparación y utilización de los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los arenavirus (AV) son virus transmitidos por roedores, que causan una fiebre hemorrágica aguda y con frecuencia mortal con malestar, edema severo y pérdida de sangre asociados y una elevada tasa de mortalidad. El virus de Lassa (VLAS) es un arenavirus del viejo mundo endémico de zonas de África occidental. Se ha informado de casos importados de fiebre de Lassa en los Estados Unidos, Europa y Canadá. Se estima que cada año aparece entre 300.000 y 500.000 casos de fiebre de Lassa, con tasas de mortalidad de 15% a 20% en pacientes hospitalizados. Los arenavirus del nuevo mundo, los virus Junin (JUNV), Machupo (VMAC), Guanarito y Sabia, son endémicos de Sudamérica y es conocido que causan miles de casos de fiebre hemorrágica grave cada año. Los arenavirus son agentes de amenaza biológica de categoría A de CDC y en el desafortunado caso de un brote de enfermedad emergente o ataque bioterrorista con estos virus, no se dispondría de ningún terapéutico o vacuna pre-exposición o post-exposición aprobado por la FDA para el público. Se han publicado estudios que han identificado epítomos de HLA de clase I restringida que pueden inducir una respuesta inmunitaria en ratones. Ver Botten, J., et al., J. Vir. 9947-9956 (oct. 2010).

A pesar de toda la reciente atención proporcionada los arenavirus debido a los brotes y elevado grado de morbilidad y mortalidad, se dispone de muy pocos tratamientos. No existe ninguna vacuna autorizada para la profilaxis de los AV y el único fármaco autorizado para el tratamiento de las infecciones por AV humanas es el fármaco antivírico ribavirina. La ribavirina ayuda a reducir la morbilidad y mortalidad asociados a la infección por AV si se administra precozmente después de la exposición, aunque adolece de elevada toxicidad y efectos secundarios. Existe una clara necesidad no satisfecha de desarrollo de fármacos de bajo coste y/o eficaces para el tratamiento y vacunas eficaces para la profilaxis en zonas endémicas de AV del mundo, así como para combatir la exposición por una amenaza a la biodefensa o para el despliegue de personal militar de EE.UU. En zonas endémicas del mundo.

Además, también existe una necesidad no satisfecha de una vacuna de arenavirus multiagente. Tal como se ha indicado anteriormente, no existen profilaxis o terapias eficaces competitivas disponibles. Según los conocimientos de que disponen los presentes inventores, la vacuna de virus vivo atenuado Junín (Candid#1) está autorizada para el uso limitado con estado de nuevo fármaco investigacional (NFI) por la FDA es la única vacuna sometida a ensayo para las infecciones por arenavirus. Sin embargo, dicha vacuna también se ha demostrado posteriormente en estudios animales que no es capaz de ofrecer protección cruzada frente a otras cepas de arenavirus.

De esta manera, sigue existiendo una necesidad de una vacuna que proporcione un fármaco eficaz o vacuna eficaz para arenavirus y una vacuna con diana en múltiples agentes arenavirus individual o simultáneamente.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1(A), 1(B), 1(C) y 1(D) muestran las puntuaciones de viremia en suero y morbilidad en cobayas vacunados con constructos no optimizados (que comprenden SEC ID nº 3) frente a vacunados con constructos optimizados (que comprenden SEC ID nº 1).

Las figuras 1(B2) y 1(D2) muestran los datos de las figuras 1(B) y 1(D) aunque añaden las puntuaciones de viremia en suero y puntuaciones de morbilidad, respectivamente, de electroporación no invasiva (NIVEP, por sus siglas en inglés).

Las figuras 2(A) y 2(B) muestran curvas de supervivencia para vacuna de ADN de VLAS no optimizada (que comprende la SEC ID nº 3) y optimizada para los codones (que comprende la SEC ID nº 1) en cobayas.

Las figuras 3(A) y 3(B) muestran los pesos y temperaturas en cobayas incluidos en el estudio de reto retrospectivo.

La figura 4 muestra un cribado auditivo BAERCOM de monos vacunados con VLAS-GPC o simuladamente vacunados que sobrevivieron al reto mortal con VLAS.

Las figuras 5(A), 5(B) y 5(C) muestran la curva de supervivencia, viremia sérica y puntuación de morbilidad para macacos Cynomolgus que recibieron la vacuna de ADN de VLAS-GPC (que comprendía la SEC ID nº 2) o vacuna de ADN simulada (que comprendía la SEC ID nº 3).

Las figuras 6(A), 6(B) y 6(C) muestran los valores seleccionados de química sanguínea para macacos Cynomolgus que recibieron la vacuna de ADN de VLAS-GPC (que comprendía la SEC ID nº 2) o la vacuna de ADN simulada (que comprendía la SEC ID nº 3).

La figura 7 muestra los valores hematológicos seleccionados para macacos Cynomolgus que recibieron la vacuna de ADN de VLAS-GPC (que comprendía la SEC ID nº 2) o la vacuna de ADN simulada (que comprendía la SEC ID nº 3).

La figura 8 muestra una alineación de secuencias entre VLAS-GPC de codones optimizados para cobayas (VLAS-GPC GP), VLAS-GPC con codones optimizados para primates no humanos (VLAS-GPC NHP) y VLAS GPC de referencia (de control).

Geisbert et al., 2005 (PLoS Medicine) da a conocer una vacuna competente para la replicación contra el virus de Lassa basada en vectores de virus de la estomatitis vesicular recombinante atenuado que expresa la glucoproteína del virus de Lassa.

Bredenbeek et al., 2006 (Virology) dan a conocer una vacuna recombinante contra la fiebre amarilla 17D que expresa glucoproteínas del virus de Lassa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La materia objeto para la que se busca protección es tal como se define en las reivindicaciones.

En particular, la invención proporciona una vacuna de plásmido de ADN que comprende una secuencia codificante de nucleótidos que codifica una o más proteínas inmunogénicas capaces de generar una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VLAS en un sujeto que lo necesita, que comprende: una secuencia codificante que codifica un precursor de glucoproteína del VLAS, de codones optimizados para dicho sujeto, en el que la secuencia codificante es SEC ID nº 1 o 2.

Un aspecto de la invención proporciona vacunas de plásmido de ADN que incluyen una secuencia codificante de nucleótidos que codifica una o más proteínas inmunogénicas capaces de generar una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VLAS en un sujeto que lo necesita. La secuencia codificante codifica un precursor de glucoproteína de un VLAS y en la que los codones han sido optimizados para el sujeto de interés.

La secuencia codificante codifica un dominio precursor de glucoproteína del VLAS (VLAS-GPC). El dominio precursor de glucoproteína de LCMV (LCMV-GPC), dominio precursor de glucoproteína de MACV (MACV-GPC), el dominio precursor de glucoproteína de JUNV (JUNV-GPC), el dominio precursor de glucoproteína de GTOV (GTOV-GPC), el dominio precursor de glucoproteína de WWAV (WWAV-GPC) o el dominio precursor de glucoproteína de PICV (PICV-GPC). Preferentemente, también se dan a conocer en la presente memoria fragmentos que comprenden un fragmento de VLAS-GPC que incluye los residuos 441 a 449, un fragmento de LCMV-GPC que incluye los residuos 447-455, un fragmento de MACV-GPC que incluye los residuos 444-452, un fragmento de JUNV-GPC que incluye los residuos 429-437, un fragmento de GTOV-GPC que incluye los residuos 427-435, un fragmento de WWAV-GPC que incluye los residuos 428-436 o un fragmento de PICV-GPC que incluye los residuos 455-463.

En una realización preferente, la vacuna de ADN consiste esencialmente en una de dichas secuencias codificantes: un agente individual o una vacuna monovalente. En otra realización preferente, la vacuna de plásmido de ADN consiste esencialmente en por lo menos dos de dichas secuencias codificantes: un agente individual o una vacuna multivalente. La vacuna monovalente o multivalente incluye las SEC ID nº 1 o 2 del VLAS-GPC dadas a conocer.

En algunas realizaciones, las vacunas de plásmido de ADN proporcionadas comprenden además un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en IL-12, IL-15, IL-28 o RANTES.

En un aspecto de la invención, las vacunas de ADN de la invención pueden utilizarse en métodos de inducción de una respuesta inmunitaria protectora contra un VLAS. En una realización, la vacuna de ADN es para la administración mediante electroporación. En algunas realizaciones, la etapa de electroporación comprende la administración de un pulso energético de electroporación en un sitio de dicho sujeto en el que se lleva a cabo la etapa de administración. Preferentemente, la etapa de administración y la etapa de electroporación se producen ambas en una capa intradérmica de dicho sujeto.

La invención dada a conocer se refiere a nuevos candidatos a vacuna de ADN que generan una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto contra el VLAS o, en algunos casos, múltiples arenavirus, incluyendo VLAS y LCMV, MACV, JUNV, GTOV, WWAV y PICV que comprende patógenos tanto del viejo mundo como del nuevo mundo.

Las vacunas proporcionadas comprenden: inmunógenos de ADN de dominio GPC de AV para incrementar la diversidad de las respuestas inmunitarias y la protección cruzada contra múltiples virus relacionados aunque divergentes. En la presente memoria se describen además inmunógenos optimizados genéticamente, en particular los dominios GPC optimizados, para los arenavirus, que son capaces de reconocer un espectro más amplio de patógenos. La vacuna de la invención es una secuencia codificante de VLAS optimizada, que puede incluir adicionalmente vacunas que reconocen los virus VLAS, LCMV, MACV, JUNV, GTOV, WWAV y PICV, y preferentemente los virus MACV y JUNV, para conseguir una formulación multiagente.

Las vacunas pueden combinarse con procedimientos de fabricación altamente innovadores y formulaciones de vacuna optimizadas, a fin de optimizar la potencia de las formulaciones multiagente. Tradicionalmente, el ADN sólo ha podido fabricarse a una concentración de 2-4 mg/ml. Esta limitación física dificulta la combinación de los plásmidos de ADN

con diana en múltiples antígenos a niveles de dosis suficientemente elevados para conseguir eficacia de protección. Mediante la utilización de un procedimiento de fabricación propietario, tal como el descrito en la patente US nº 7.238.522 y en la publicación de patente US nº 2009-0004716, los plásmidos de ADN pueden fabricarse a una concentración >10 mg/ml con elevada pureza. Dicha formulación de alta concentración también resulta beneficiosa para la administración eficiente con un volumen de inyección pequeño (0,1 ml), tal como para la inyección ID convencional.

Las vacunas pueden combinarse además con sistemas de administración de ADN altamente innovadores y basados en la electroporación (EP) eficiente, a fin de incrementar la potencia de la vacuna de ADN inyectada. Los sistemas de administración de EP con profundidades de electroporación pequeñas y parámetros eléctricos bajos/transitorios hacen que los nuevos dispositivos resulten considerablemente más tolerables en aplicaciones profilácticas y vacunaciones masivas.

Dicha vacuna de ADN combinada con los procedimientos de fabricación y dispositivos de administración mediante electroporación proporcionados pueden proporcionar los beneficios siguientes, entre otros:

- ninguna respuesta inducida por el vector - refuerzos repetidos; vacunas múltiples/de combinación
- mayor potencia que los vectores víricos en primates y seres humanos
- ventajas de fabricación

En la presente memoria se proporcionan datos de un candidato a vacuna de VLAS como agente individual que se ha mostrado que induce en un sujeto una protección de 100% contra la mortalidad en un modelo de reto en cobaya y en un modelo de reto en un primate no humano. El candidato a vacuna de VLAS se ha demostrado en un modelo de primate no humano que facilita la traducción clínica de este enfoque de vacuna. Dicho éxito frente a dos modelos de reto diferentes no se ha conseguido anteriormente en la literatura con ningún otro candidato de vacuna con arnavirus - con vector o sin vector.

El candidato a vacuna de VLAS es una vacuna candidata multiagente con diana en virus tanto del viejo mundo como del nuevo mundo. El antígeno GPC (el componente inmunogénico de los virus) no se encuentra altamente conservado en VLAS, MACV y JUNV, con homologías de entre 42% y 71% en los diferentes subtipos de arnavirus (VLAS-MACV/JUNV y MACV-JUNV, respectivamente) y diferencias de 2-10% entre las secuencias dentro de los diferentes subtipos. De esta manera, el desarrollo de una vacuna multiagente no resulta evidente y está cargado de varios retos técnicos.

Los candidatos a vacuna proporcionados en la presente memoria han optimizado las vacunas de GPC candidatas de cada uno de los subtipos de virus diana, de manera que son individualmente eficaces contra las cepas respectivas (por ejemplo, VLAS, JUNV y MACV) y colectivamente presentan protección cruzada contra estas y otras cepas de arnavirus. Los candidatos a vacuna se fabrican de manera que los componentes de plásmido se encuentren a concentraciones elevadas (>10 mg/ml). Los componentes del candidato a vacuna pueden combinarse para la administración con EP. La administración de EP se ha demostrado que mejora la transfección del ADN y la eficiencia de la expresión génica en más de 1000x y mejora la inmunogenicidad y la eficacia en más de 10-100x respecto a la administración de ADN sin EP. La administración de vacuna de múltiple ADN-bajo volumen de inyección-EP hace que este enfoque resulte especialmente adecuado para la vacunación profiláctica y, en particular, la administración de vacunas multiagente.

El enfoque de vacuna de ADN descrito en la presente memoria posee una clara ventaja de seguridad respecto a otros enfoques competidores de virus vivo atenuado/virus muerto y otros enfoques basados en vectores (Ad5, MVA, YF) debido a que la vacuna de ADN no es replicante, no se integra en el genoma y, al contrario que los vectores, no da lugar a serología antivector, que puede limitar adicionalmente la potencia de las vacunas con vector. Actualmente se han desarrollado vacunas de ADN en varios miles de sujetos humanos en unos cuantos cientos de diferentes ensayos de vacuna con poco que señalar desde el punto de vista de la seguridad. Junto con la administración de EP, las vacunas de ADN-EP (VIH, VHP, influenza, VHC, cáncer de próstata y melanoma) se han administrado en más de 150 sujetos y en más de 350 vacunaciones por la vía intramuscular o intradérmica y los perfiles de seguridad han sido ordinarios.

En una realización, el candidato a vacuna puede presentar las especificaciones siguientes:

nº	Característica	Diana	Aceptable	Justificación
1.	Diana de vacuna	Multiagente (VLAS, LCMV, MACV, JUNV, GTOV, WWAV y PICV)	Agente individual	desplegar 2, 3 o más vacunas de agente individual si se cumplen los criterios de eficacia
2.	Formulación y administración de vacuna	0,1 ml; administración ID en un único sitio; objetivo una dosis elevada (1 mg/plásmido para agente	0,2 ml; administración ID en dos sitios	Necesidad claramente no satisfecha y falta de contramedidas eficaces pueden hacer que dos vacunaciones

		individual; 0,3 mg/plásmido para agentes múltiples)		resulten aceptables para la utilización en biodefensa
3.	Selección de adyuvantes	Opcionalmente puede añadirse un adyuvante a la formulación de vacuna	Se incluye IL~12, IL~28 o RANTES	Resultaría aceptable un adyuvante si proporcionase cualesquiera beneficios, tales como una inmunogenicidad potenciada, respuestas de protección cruzada y/o características de reducción de la dosis para la formulación de la vacuna
4.	Eficacia vacunal	protección de 90-100% frente a la mortalidad en un modelo de reto en cobayas contra las tres cepas	protección de 90-100% frente a la mortalidad en un modelo de reto en cobayas contra una única cepa	desplegar 3 vacunas de agente individual si se cumplen los criterios de eficacia
5.	Inmunogenicidad vacunal	Demostración de respuestas celulares y humorales específicas de antígeno inducidas por la vacuna en ELISpot IFNg modelo NHP, ICS, función de eliminación (Perforina, T-bet, granzima); ELISA NAb	Demostración de respuestas celulares o humorales específicas de antígeno inducidas por la vacuna en un modelo de cobaya	No se conocen correlatos de protección para AV. Caracterización de respuestas tanto celulares como humorales para los fines de entender la magnitud y alcance de las respuestas inmunitarias que pueden conseguirse en NHP.

Se realizan retos en cobayas (cepa 13) y en macacos Cynomolgus. Tal como se indica en la sección de investigación, ambos son modelos establecidos de reto de arenavirus.

- 5 En algunas realizaciones, los candidatos de vacuna contienen 2 o más candidatos de vacuna (VLAS, LCMV, MACV, JUNV, GTOV, WWAV y PICV), que pueden proporcionar protección cruzada, mientras que en otras realizaciones, hay una combinación de sólo dos candidatos de vacuna, y más preferentemente, ejemplos de dos plásmidos, uno del viejo mundo y otro del nuevo mundo, p.ej., VLAS y JUNV o MACV, para proporcionar protección frente a la totalidad de las múltiples cepas de AV. En un ejemplo, la vacuna de ADN comprende dos plásmidos de vacuna de ADN (VLAS + JUNV/MACV). En otro ejemplo, la vacuna de ADN comprende un candidato de vacuna y un plásmido de citoquina. En otro ejemplo, la vacuna de ADN comprende tres candidatos de vacuna de plásmido, incluyendo VLAS, JUNV y MACV.

15 Existen algunas realizaciones en las que los candidatos de vacuna incluyen además adyuvantes moleculares, p.ej., IL-12 e IL-28 y RANTES. Los adyuvantes pueden incrementar el alcance de las respuestas inmunitarias, su magnitud o alterar el fenotipo inmunitario de la vacuna, proporcionando un beneficio adicional a la vacuna, tal como: una eficacia de protección cruzada entre cepas (alcance) y/o una eficacia de 100% a una dosis más baja (potencia).

20 En algunas realizaciones, el candidato de vacuna es un único plásmido que reconoce VLAS. El candidato de plásmido único se ha demostrado que resulta altamente eficaz en la protección de cobayas y primates no humanos ("PNH") frente a un reto mortal.

Definiciones.

25 La terminología utilizada en la presente memoria presenta el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y que no pretender ser limitativa. Tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30 Para la recitación de los intervalos numéricos en la presente memoria, cada número intermedio dentro de los mismos con el mismo grado de precisión se encuentra explícitamente contemplado. Por ejemplo, en el intervalo 6-9, los números 7 y 8 se encuentran contemplados además de 6 y 9, y en el intervalo 6,0-7,0, los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 se encuentran explícitamente contemplados.

Adyuvante

35 El término "adyuvante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier molécula añadida a las vacunas de ADN indicadas en la presente memoria para potenciar la inmunogenicidad del antígeno codificado por los constructos de ADN, que constituyen las vacunas de ADN, y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes que se indican posteriormente en la presente memoria.

40

Secuencia codificante

La expresión “secuencia codificante” o “ácido nucleico codificante” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los ácidos nucleicos (molécula de ARN o ADN) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante puede incluir además señales de inicio y terminación operablemente ligadas a elementos reguladores, incluyendo un promotor y señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células de un individuo o mamífero en el que se administra el ácido nucleico.

Complemento

El término “complemento” o “complementario” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ácido nucleico que establece emparejamiento de bases de Watson-Crick (p.ej., A-T/U y C-G) o de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótido de las moléculas de ácidos nucleicos.

Electroporación

El término “electroporación”, “electropermeabilización” o “potenciación electrocinética” (“EP”) tal como se utilizan intercambiamente en la presente memoria se refiere a la utilización de un pulso de campo eléctrico transmembranal para inducir rutas microscópicas (poroso) en una biomembrana; su presencia permite que biomoléculas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua pasen de un lado de la membrana celular al otro.

Fragmento

El término “fragmento” tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a secuencias de ácidos nucleicos se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o una parte de la misma, que codifica un polipéptido capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona cruzadamente con un antígeno GPC de arnavirus. Los fragmentos pueden ser fragmentos de ADN seleccionados de por lo menos una de las diversas secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de consenso y constructos que comprenden dichas secuencias. Los fragmentos de ADN pueden comprender secuencias codificantes del líder de inmunoglobulina, tales como secuencias de IgE o IgG. Los fragmentos de ADN pueden codificar los fragmentos de proteína indicados posteriormente.

El término “fragmento” con respecto a las secuencias polipeptídicas se refiere a un polipéptido capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona cruzadamente con un antígeno de arnavirus, incluyendo, p.ej., el virus de Lassa (VLAS), el virus de la coriomeningitis (LCMV), el virus de Junín (JUNV), el virus Machupo (MACV), el virus Guanarito linfocítico (GTOV), el virus Arroyo agua blanca (WWAV) y el virus Pichinde (PICV).

La secuencia del precursor de glucoproteína del VLAS (VLAS-GPC) presenta aproximadamente 491 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones. Los fragmentos de VLAS-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de VLAS-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 441 a 449 de la región GPC. En algunas realizaciones, los fragmentos de VLAS-GPC comprenden por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la SEC ID n° 4 o n° 5.

La secuencia del precursor de glucoproteína del LCMV (LCMV-GPC) presenta aproximadamente 498 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI NP_694851. Los fragmentos de LCMV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de LCMV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 447 a 455.

La secuencia del precursor de glucoproteína del JUNV (JUNV-GPC) presenta aproximadamente 485 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI BAA00964. Los fragmentos de JUNV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de JUNV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 429 a 437.

La secuencia del precursor de glucoproteína del MACV (MACV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI AAN05425. Los fragmentos de MACV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de MACV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 444 a 452.

La secuencia del precursor de glucoproteína del GTOV (GTOV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI AAN05423. Los fragmentos de GTOV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de GTOV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 427 a 435.

La secuencia del precursor de glucoproteína del WWAV (WWAV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI AAK60497. Los

fragmentos de WWAV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de WWAV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 428 a 436.

La secuencia del precursor de glucoproteína del PICV (PICV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del AAC32281. Los fragmentos de PICV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de PICV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 455 a 463.

Construtto genético

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "construtto genético" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante incluye señales de inicio y terminación operablemente ligadas a elementos reguladores, incluyendo un promotor y señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células de un individuo en el que se administra la molécula de ácido nucleico. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "forma expresable" se refiere a constructos genéticos que contienen los elementos reguladores necesarios operablemente ligados a una secuencia codificante que codifica una proteína de manera que, en caso de hallarse presentes en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.

Homología

La homología de múltiples alineaciones de secuencia y el filograma se generaron utilizando el software ClustalW.

Idéntico

El término "idéntico" o "identidad" tal como se utiliza en la presente memoria en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a que las secuencias presentan un porcentaje especificado de residuos que son iguales a lo largo de una región especificada. El porcentaje puede calcularse mediante alineación óptima de las dos secuencias, comparación de las dos secuencias a lo largo de la región especificada, determinación del número de posiciones en las que aparece el residuo idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, división del número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la región especificada, y multiplicación del resultado por 100, rindiendo el porcentaje de identidad de las secuencias. En los casos en que las dos secuencias son de diferente longitud o la alineación produce uno o más extremos protuberantes y la región especificada de la comparación incluye únicamente una sola secuencia, los residuos de la secuencia única están incluidos en el denominador, aunque no en el numerador del cálculo. En la comparación de ADN y ARN, la timina (T) y el uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad puede llevarse a cabo manualmente o mediante la utilización de un algoritmo de secuencias de ordenador, tal como BLAST o BLAST 2.0.

Respuesta inmunitaria

La "respuesta inmunitaria" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la activación del sistema inmunitario del huésped, p.ej., el de un mamífero, en respuesta a la introducción del antígeno, tal como un antígeno de arnavirus. La respuesta inmunitaria puede producirse en forma de una respuesta celular o humoral, o de ambas.

Ácido nucleico

La expresión "ácido nucleico", u "oligonucleótido" o "polinucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a por lo menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La ilustración de una cadena sencilla define además la secuencia de la cadena complementaria. De esta manera, un ácido nucleico comprende además la cadena complementaria de una cadena sencilla ilustrada. Pueden utilizarse muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo propósito que un ácido nucleico dado. De esta manera, un ácido nucleico comprende además ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una cadena sencilla proporciona una sonda que puede hibridarse con una secuencia diana bajo condiciones de hibridación restrictiva. De esta manera, un ácido nucleico comprende además una sonda que se hibrida bajo condiciones de hibridación restrictiva.

Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena, o pueden contener partes de tanto secuencia de doble cadena como de cadena sencilla. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Pueden utilizarse ácidos nucleicos mediante métodos de síntesis química o mediante métodos recombinantes.

Operablemente ligado

La expresión "operablemente ligado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la expresión de un gen se encuentra bajo el control de un promotor con el que se encuentra espacialmente conectado. Un promotor

puede situarse 5' (cadena arriba) o 3' (cadena abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente igual a la distancia entre el promotor y el gen que controla en el gen del que se deriva el promotor. Tal como es conocido de la técnica, la variación de dicha distancia puede ajustarse sin pérdida de función del promotor.

Promotor

El término "promotor" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula sintética o derivada naturalmente que es capaz de proporcionar, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias específicas reguladoras de la transcripción para potenciar adicionalmente la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de las mismas. Un promotor puede comprender además elementos intensificadores o represores distales, que pueden estar situados hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de transcripción. Un promotor puede derivarse de diversas fuentes, incluyendo víricas, bacterianas, fúngicas, vegetales, de insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génico constitutivamente, o diferencialmente con respecto a la célula, el tejido o el órgano en el que se produce la expresión o con respecto al estadio de desarrollo en el que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos, tales como tensiones fisiológicas, patógenos, iones metálicos o agentes inductores. Entre los ejemplos representativos de promotores se incluyen el promotor T7 de bacteriófago, el promotor T3 de bacteriófago, el promotor SP6, el operador-promotor lac, el promotor tac, el promotor tardío del SV40, el promotor temprano del SV40, el promotor de RSV-LTR, el promotor IE del CMV, el promotor temprano del SV40 o el promotor tardío del SV40 y el promotor IE del CMV.

Condiciones de hibridación restrictiva

La expresión "condiciones de hibridación restrictiva" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a condiciones bajo las que una primera secuencia de ácidos nucleicos (p.ej., una sonda) se hibridará con una segunda secuencia de ácidos nucleicos (p.ej., una diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Las condiciones restrictivas pueden seleccionarse para que sean aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibrida con la secuencia diana en el equilibrio (ya que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a la T_m , el 50% de las sondas se encuentra ocupado en el equilibrio). Las condiciones restrictivas pueden ser aquellas en las que la concentración salina es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion sodio, tal como aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (p.ej., de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos) y de por lo menos aproximadamente 60°C para sondas largas (p.ej., de más de aproximadamente 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también pueden alcanzarse con la adición de agentes desestabilizadores, tales como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser de por lo menos 2 a 10 veces el nivel de hibridación de fondo. Las condiciones ejemplares de hibridación restrictiva incluyen las siguientes: formamida al 50%, 5x SSC y SDS al 1%, incubación a 42°C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65°C, con lavado en 0,2x SSC y SDS al 0,1% a 65°C.

Sustancialmente complementario

La expresión "sustancialmente complementario" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que una primera secuencia es por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica al complemento de una segunda secuencia a lo largo de una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720, 810, 900, 990, 1080, 1170, 1260, 1350, o 1440 o más nucleótidos o aminoácidos, o que las dos secuencias se hibridan bajo condiciones de hibridación restrictiva.

Sustancialmente idéntico

La expresión "sustancialmente idéntico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que una primera y una segunda secuencias son por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a lo largo de una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720, 810, 900, 990, 1080, 1170, 1260, 1350, o 1440 o más nucleótidos o aminoácidos, o con respecto a ácidos nucleicos, si la primera secuencia es sustancialmente complementaria al complemento de la segunda secuencia.

Subtipo o serotipo

"Subtipo" o "serotipo": tal como se utilizan en la presente memoria, intercambiamente, y en referencia a antígenos de arnavirus, se refiere a que las variantes genéticas de un antígeno de arnavirus, tal como un subtipo (o variante) resultan reconocidas por el sistema inmunitario como diferentes de un subtipo diferente.

Variante

El término "variante" utilizado en la presente memoria con respecto a un ácido nucleico se refiere a: (i) una parte o fragmento de una secuencia de nucleótidos de referencia, (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos de referencia o parte de la misma, (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico referenciado o el complemento del mismo, o (iv) un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de referencia, complemento del mismo o secuencias sustancialmente idénticas al mismo.

El término "variante" con respecto a un péptido o polipéptido que difiere en secuencia de aminoácidos mediante la inserción, delección o sustitución conservadora de aminoácidos pero que conserva por lo menos una actividad biológica. Variante también puede referirse a una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína referenciada con una secuencia de aminoácidos que conserva por lo menos una actividad biológica. Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, sustituir un aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (p.ej., hidrofiliidad, grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en la técnica que típicamente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, mediante la consideración del índice hidropático de los aminoácidos, tal como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en la consideración de su hidrofobicidad y carga. Es conocido de la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y todavía conservar la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen los aminoácidos con índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofiliidad de los aminoácidos también puede utilizarse para revelar sustituciones que resultarían en proteínas que conservan la función biológica. La consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite calcular la hidrofiliidad media local más alta de dicho péptido; una medida útil que se ha informado de que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Patente US nº 4.554.101. La sustitución de aminoácidos con valores similares de hidrofiliidad puede resultar en péptidos que conservan la actividad biológica, por ejemplo la inmunogenicidad, tal como se entiende en la técnica. Pueden llevarse a cabo sustituciones por aminoácidos con valores de hidrofiliidad separados por ± 2 . Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de los aminoácidos están influidos por la cadena lateral particular de ese aminoácido. Consistentemente con esta observación, las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica se entiende que dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y particularmente de las cadenas laterales de dichos aminoácidos, según revelan la hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y otras propiedades.

Vector

El término "vector" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un vector, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano o cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante, y preferentemente, es un plásmido de ADN.

Excipientes y otros componentes de la vacuna

La vacuna puede comprender además otros componentes, tales como un agente facilitador de la transfección, un excipiente farmacéuticamente aceptable y un adyuvante. El excipiente farmacéuticamente aceptable pueden ser moléculas funcionales, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente facilitador de la transfección, que puede incluir agentes activos en superficie, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOM), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS, incluyendo monofosforil lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona, vesículas tales como escualeno y escualano, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes conocidos facilitadores de la transfección.

El agente facilitador de la transfección puede ser un polianión, polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o lípido. El agente facilitador de la transfección puede ser poli-L-glutamato. El poli-L-glutamato puede estar presente en la vacuna a una concentración inferior a 6 mg/ml. El agente facilitador de la transfección puede incluir además agentes activos en superficie, tales como complejos inmunoestimuladores (ISCOM), adyuvante incompleto de Freund, análogo de IPS, incluyendo monofosforil lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona y vesículas, tales como escualeno y escualano, y ácido hialurónico, que también pueden utilizarse administrados junto con el constructo genético. En algunas realizaciones, las vacunas de plásmido de ADN pueden incluir además un agente facilitador de la transfección, tal como lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos de la técnica, como mezcla de ADN-liposomas (ver, por ejemplo, el documento nº WO9324640), iones calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes conocidos facilitadores de la transfección. El agente facilitador de la transfección es un polianión, polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o lípido. La concentración del agente de transfección en la vacuna es inferior a 4 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 1 mg/ml, inferior a 0,750 mg/ml, inferior a 0,500 mg/ml, inferior a 0,250 mg/ml, inferior a 0,100 mg/ml, inferior a 0,050 mg/ml o inferior a 0,010 mg/ml.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un adyuvante. El adyuvante puede ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o que se administran como proteínas en combinación con el plásmido anteriormente indicado en la vacuna. El adyuvante puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón- α (IFN-

α), interferón- β (IFN- β), interferón- γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimioquina cutánea atractora de células T (CTACK), quimioquina epitelial expresada en el timo (TECK), quimioquina epitelial asociada a mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, incluyendo IL-15 con delección de la secuencia de señal y que incluye opcionalmente el péptido de señal de IgE. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, o una combinación de los mismos.

Entre otros genes que pueden ser adyuvantes útiles se incluyen los que codifican: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, selectina-L, selectina-P, selectina-E, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento fibroblástico, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento vascular endotelial, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, ligando de RANK, Ox40, ligando de Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

La vacuna puede comprender además un agente facilitador de vacuna genética tal como se describe en el documento n° de serie US 021.579, presentado el 1 de abril de 1994.

La vacuna puede formularse según el modo de administración que debe utilizarse. Una composición farmacéutica de vacuna inyectable puede ser estéril, libre de pirógenos y libre de partículas. Puede utilizarse una formulación o solución isotónica. Entre los aditivos para la isotonicidad pueden incluirse cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. La vacuna puede comprender un agente vasoconstrictor. Las soluciones isotónicas pueden incluir solución salina tamponada con fosfato. La vacuna puede comprender además estabilizadores, incluyendo gelatina y albúmina. Los estabilizadores pueden permitir que la formulación sea estable a temperatura de laboratorio o ambiente durante periodos de tiempo prolongados, incluyendo LGS, policationes o polianiones.

Método de vacunación

Las vacunas de plásmido de ADN dadas a conocer en la presente memoria pueden resultar de utilidad en un método de vacunación de un sujeto. El método utiliza la electroporación como mecanismo para administrar la vacuna. La electroporación puede llevarse a cabo mediante un dispositivo mínimamente invasivo.

Antígenos GPC de AV de codones optimizados

La secuencia del precursor de glucoproteína del VLAS (VLAS-GPC) presenta aproximadamente 491 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones. Los fragmentos de VLAS-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de VLAS-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 441 a 449 de la región GPC. En algunas realizaciones, los fragmentos de VLAS-GPC comprenden por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la SEC ID n° 4 o n° 5.

La secuencia del precursor de glucoproteína del LCMV (LCMV-GPC) presenta aproximadamente 498 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI NP_694851. Los fragmentos de LCMV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de LCMV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 447 a 455.

La secuencia del precursor de glucoproteína del JUNV (JUNV-GPC) presenta aproximadamente 485 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI BAA00964.. Los fragmentos de JUNV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de JUNV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 429 a 437.

La secuencia del precursor de glucoproteína del MACV (MACV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI AAN05425.. Los fragmentos de MACV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de MACV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 444 a 452.

La secuencia del precursor de glucoproteína del GTOV (GTOV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI AAN05423.. Los fragmentos de GTOV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de GTOV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 427 a 435.

La secuencia del precursor de glucoproteína del WWAV (WWAV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del NCBI AAK60497. Los

fragmentos de WWAV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de WWAV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 428 a 436.

La secuencia del precursor de glucoproteína del PICV (PICV-GPC) presenta aproximadamente 496 aminoácidos y preferentemente ha sido optimizado para sus codones - ver el número de acceso del AAC32281. Los fragmentos de PICV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de PICV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 455 a 463.

Secuencias de nucleótidos - secuencias codificantes y constructos y plásmidos

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del VLAS (VLAS-GPC) presenta aproximadamente 1476 nucleótidos y ha sido optimizada para sus codones. Las secuencias codificantes de fragmentos inmunogénicos de VLAS-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de VLAS-GPC codificado y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 441 a 449 de la región GPC. Estas secuencias codificantes de VLAS-GPC son las SEC ID n° 1 y n° 2. Las secuencias codificantes de los fragmentos de VLAS-GPC comprenden por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la SEC ID n° 4 o n° 5. Las secuencias codificantes de los fragmentos de VLAS-GPC comprenden por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la SEC ID n° 1 o n° 2.

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del LCMV (LCMV-GPC) presenta aproximadamente 1494 nucleótidos y preferentemente ha sido optimizada para sus codones - ver el número de acceso del NCBI NP_694851. Las secuencias codificantes de fragmentos inmunogénicos de LCMV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de LCMV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 447 a 455.

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del JUNV (JUNV-GPC) presenta aproximadamente 1455 nucleótidos y preferentemente ha sido optimizada para sus codones - ver el número de acceso del NCB BAA00964. Las secuencias codificantes de fragmentos inmunogénicos de JUNV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de JUNV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 429 a 437.

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del MACV (MACV-GPC) presenta aproximadamente 1488 nucleótidos y preferentemente ha sido optimizada para sus codones - ver el número de acceso del NCB AAN05425. Las secuencias codificantes de fragmentos inmunogénicos de MACV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de MACV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 444 a 452.

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del GTOV (GTOV-GPC) presenta aproximadamente 1488 nucleótidos y preferentemente ha sido optimizada para sus codones - ver el número de acceso del NCB AAN05423. La secuencia codificante de fragmentos inmunogénicos de GTOV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de GTOV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 427 a 435.

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del WWAV (WWAV-GPC) presenta aproximadamente 1488 nucleótidos y preferentemente ha sido optimizada para sus codones - ver el número de acceso del NCB AAK60497. Las secuencias codificantes de fragmentos inmunogénicos de WWAV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de WWAV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 428 a 436.

La secuencia codificante de nucleótidos del precursor de glucoproteína del PICV (PICV-GPC) presenta aproximadamente 1488 nucleótidos y preferentemente ha sido optimizada para sus codones - ver el número de acceso del NCB AAC32281. Las secuencias codificantes de fragmentos inmunogénicos de PICV-GPC pueden comprender por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de PICV-GPC y preferentemente fragmentos que contienen los residuos 455 a 463.

En la presente memoria se proporcionan constructos genéticos que pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno GPC de AV dado a conocer en la presente memoria, incluyendo fragmentos inmunogénicos del mismo. El constructo genético puede encontrarse presente en la célula como molécula extracromosómica funcional. El constructo genético puede ser un minicromosoma lineal, incluyendo centrómero y telómeros, o plásmidos o cósmidos.

El constructo genético también puede ser parte de un genoma de un vector vírico recombinante, incluyendo adenovirus recombinantes, virus asociado a adenovirus recombinante y Vaccinia recombinante. El constructo genético puede ser parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o en vectores microbianos recombinantes que viven en células.

Los constructos genéticos pueden comprender elementos reguladores para la expresión génica de las secuencias codificantes del ácido nucleico. Los elementos reguladores pueden ser un promotor, un intensificador, un codón de inicio, un codón de parada o una señal de poliadenilación.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden constituir un constructo genético que puede ser un vector. El vector puede ser capaz de expresar un antígeno en la célula de un mamífero en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero. El vector puede ser recombinante. El vector puede comprender un ácido nucleico heterólogo codificante del antígeno. El vector puede ser un plásmido. El vector puede resultar útil para transfectar células con ácido nucleico codificante de un antígeno, en el que la célula huésped transformada se cultiva y se mantiene bajo condiciones en las que tiene lugar la expresión del antígeno.

Las secuencias codificantes pueden optimizarse para la estabilidad y niveles elevados de expresión. En algunos casos, se seleccionan codones para reducir la formación de estructura secundaria del ARN, tal como la formada por enlaces intramoleculares.

El vector puede comprender ácido nucleico heterólogo codificante de un antígeno y puede comprender además un codón de inicio, que puede encontrarse cadena arriba de la secuencia codificante del antígeno, y un codón de parada, que puede encontrarse cadena abajo de la secuencia codificante del antígeno. El codón de inicio y el codón de terminación puede encontrarse en el mismo marco que la secuencia codificante del antígeno. El vector puede comprender además un promotor que se encuentra operablemente ligado a la secuencia codificante del antígeno. El promotor operablemente ligado a la secuencia codificante del antígeno puede ser un promotor del virus 40 del simio (SV40, por sus siglas en inglés), un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés), un promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), un promotor del virus de Moloney, un promotor del virus de la leucosis aviar (ALV), un promotor de citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato del CMV, un promotor del virus de Epstein-Barr (EBV) o un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV). El promotor también puede ser un promotor de un gen humano, tal como la actina humana, la miosina humana, la hemoglobina humana, la creatina muscular humana o la metalotioneína humana. El promotor también puede ser un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico muscular o cutáneo, natural o sintético. Se describen ejemplos de dichos promotores en la solicitud publicada de patente US nº US20040175727.

El vector puede comprender además una señal de poliadenilación, que puede encontrarse cadena abajo de la secuencia codificante de la proteína GPC de AV. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación del SV40, una señal de poliadenilación de LTR, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (bGH, por sus siglas en inglés), una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana (hGH) o una señal de poliadenilación de la β -globina humana. La señal de poliadenilación del SV40 puede ser una señal de poliadenilación de un vector pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

El vector puede comprender además un intensificador situado cadena arriba de la secuencia codificante de la proteína GPC de AV. El intensificador puede resultar necesario para la expresión del ADN. El intensificador puede ser actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o un intensificador vírico, tal como uno de CMV, HA, RSV o EBV. Se describen intensificadores de la función polinucleótida en las patentes US nº 5.593.972 y nº 5.962.428 y documento nº WO94/016737.

El vector puede comprender además un origen de replicación de mamífero con el fin de mantener extracromosómico el vector y producir múltiples copias del vector en la célula. El vector puede ser pWRG7077 (ver Schmaljohn et al., infra), pVAX1, pCEP4 o pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA), que pueden comprender el origen de replicación del virus de Epstein-Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1, que pueden producir replicación episómica de elevado número de copia sin integración. El vector puede ser pVAX1 o una variante de pVax1 con cambios tales como el plásmido variante descrito en la presente memoria. El plásmido pVax1 variante es una variante de 2998 pares de bases del vector plásmido esquelético pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El promotor del CMV se encuentra situado en las bases 137 a 724. El promotor/sitio de cebado de T7 se encuentra en las bases 664 a 683. Se encuentran sitios de clonación múltiple en las bases 696 a 811. La señal de poliadenilación de la GH bovina se encuentra en las bases 829 a 1053. El gen de resistencia a la canamicina se encuentra en las bases 1226 a 2020. El origen de pUC se encuentra en las bases 2320 a 2993. Basándose en la secuencia de pVAX1 disponible de Invitrogen, se encontraron las mutaciones siguientes en la secuencia de pVAX1 que se utilizó como el esqueleto para los plásmidos 1-6 indicados en la presente memoria.

C>G 241 en el promotor del CMV

C>T 1942 esqueleto, cadena abajo de la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (bGHpolyA)

A> - 2876 esqueleto, cadena abajo del gen de canamicina

C>T 3277 en la mutación de elevado número de copia del origen de replicación de pUC (Ori) (ver Nucleic Acid Research 1985)

G>C 3753 en el mismo extremo de Ori de pUC cadena arriba del sitio de RNaseH

Los pares de bases 2, 3 y 4 han sido modificados de ACT a CTG en el esqueleto, cadena arriba del promotor del CMV.

El esqueleto del vector puede ser pAV0242. El vector puede ser un vector adenovirus de tipo 5 (Ad5) sin capacidad de replicación.

El vector puede comprender además una secuencia reguladora, que puede ser idónea para la expresión génica en una célula de mamífero o humana en la que se administra el vector. La secuencia codificante de GPC de AV puede comprender un codón que puede permitir la transcripción más eficiente de la secuencia codificante en la célula huésped.

El vector puede ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en *Escherichia coli* (*E. coli*). El vector también puede ser pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El vector también puede ser un sistema completo de expresión baculovírica MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en células de insecto. El vector también puede ser pcDNA1 o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO). El vector puede ser un vector o sistema de expresión para producir proteínas mediante técnicas rutinarias y materias primas fácilmente disponibles, incluyendo Sambrook et al., Molecular Cloning and Laboratory Manual, segunda Ed., Cold Spring Harbor (1989).

Composiciones farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas según la presente invención, también denominadas vacunas de ADN en la presente memoria, que comprenden entre aproximadamente 1 nanogramo y aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden entre: 1) por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos, o por lo menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos, o por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg o más, y 2) hasta 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos inclusive, o hasta 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, o 1000 microgramos, inclusive, o hasta 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg inclusive. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden entre aproximadamente 5 nanogramos y aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden entre aproximadamente 25 nanogramos y aproximadamente 5 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 50 nanogramos y aproximadamente 1 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 15 y aproximadamente 150 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 25 y aproximadamente 75 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 35 y aproximadamente 40 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre

aproximadamente 25 y aproximadamente 60 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 35 y aproximadamente 45 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 25 y aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 microgramos de ADN.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se formulan según el modo de administración que debe utilizarse. En los casos en que las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, libres de pirógenos y libres de partículas. Preferentemente se utiliza una formulación isotónica. Generalmente, entre los aditivos para la isotonicidad pueden incluirse cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, resultan preferentes soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Entre los estabilizadores se incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente vasoconstrictor a la formulación.

La composición farmacéutica es una vacuna de plásmido de ADN.

En la presente memoria se proporciona una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria protectora contra uno o más AV. La vacuna puede comprender el constructo genético comentado en la presente memoria.

Aunque sin respaldo de una teoría científica, la vacuna puede utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria (humoral, celular o ambas) ampliamente contra uno o más tipos de AV.

Las vacunas de ADN se dan a conocer en las patentes US nº 5.593.972, nº 5.739.118, nº 5.817.637, nº 5.830.876, nº 5.962.428, nº 5.981.505, nº 5.580.859, nº 5.703.055 y nº 5.676.594. La vacuna de ADN puede comprender además elementos o reactivos que inhiben su integración en el cromosoma. La vacuna puede ser un ARN de la proteína GPC de AV. La vacuna de ARN puede introducirse en la célula.

La vacuna puede ser una vacuna recombinante que comprende el constructo genético o antígeno descrito en la presente memoria. La vacuna puede comprender además una o más proteínas nucleares GPC de AV en forma de una o más subunidades proteicas, una o más partículas víricas muertas que comprenden una o más proteínas GPC de AV, o una o más partículas víricas atenuadas que comprenden una o más proteínas GPC de AV. La vacuna atenuada pueden ser vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas y vacunas que utilizan vectores recombinantes para administrar genes foráneos que codifican una o más proteínas GPC de AV, y también vacunas de subunidades y glucoproteínas. Se describen ejemplos de vacunas vivas atenuadas, las que utilizan vectores recombinantes para administrar antígenos foráneos, vacunas de subunidades y vacunas de glucoproteínas, en las patentes US nº 4.510.245, 4.797.368, 4.722.848, 4.790.987, 4.920.209, 5.017.487, 5.077.044, 5.110.587, 5.112.749, 5.174.993, 5.223.424, 5.225.336, 5.240.703, 5.242.829, 5.294.441, 5.294.548, 5.310.668, 5.387.744, 5.389.368, 5.424.065, 5.451.499, 5.453.364, 5.462.734, 5.470.734, 5.474.935, 5.482.713, 5.591.439, 5.643.579, 5.650.309, 5.698.202, 5.955.088, 6.034.298, 6.042.836, 6.156.319 y 6.589.529.

La vacuna puede comprender vectores y/o proteínas dirigidas a múltiples AV de múltiples zonas particulares del mundo. La vacuna proporcionada puede utilizarse para inducir respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas inmunitarias terapéuticas o profilácticas. Pueden generarse anticuerpos y/o células T asesinas que se dirigen a la proteína GPC del AV y también ampliamente a múltiples virus AV. Pueden aislarse dichos anticuerpos y células.

La vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente farmacéuticamente aceptable pueden ser moléculas funcionales, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente facilitador de la transfección, que puede incluir agentes activos en superficie, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOM), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS, incluyendo monofosforil lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona, vesículas tales como escualeno y escualano, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes conocidos facilitadores de la transfección.

El agente facilitador de la transfección es un polianión o polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o un lípido. El agente facilitador de la transfección es poli-L-glutamato y, más preferentemente, el poli-L-glutamato se encuentra presente en la vacuna a una concentración inferior a 6 mg/ml. El agente facilitador de la transfección puede incluir además agentes activos en superficie, tales como complejos inmunoestimuladores (ISCOM), adyuvante incompleto de Freund, análogo de IPS, incluyendo monofosforil lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona y vesículas, tales como escualeno y escualano, y ácido hialurónico, que también pueden utilizarse administrados junto con el constructo genético. En algunas realizaciones, las vacunas de vector de ADN pueden incluir además un agente facilitador de la transfección, tal como lípidos, liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos de la técnica, como

mezcla de ADN-liposomas (ver, por ejemplo, el documento n° WO9324640), iones calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes conocidos facilitadores de la transfección. Preferentemente, el agente facilitador de la transfección es un polianión o policación, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o un lípido. La concentración del agente de transfección en la vacuna es inferior a 4 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 1 mg/ml, inferior a 0,750 mg/ml, inferior a 0,500 mg/ml, inferior a 0,250 mg/ml, inferior a 0,100 mg/ml, inferior a 0,050 mg/ml o inferior a 0,010 mg/ml.

Adyuvantes

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un adyuvante. El adyuvante puede ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o que se administran como proteínas en combinación con el plásmido anteriormente indicado en la vacuna. El adyuvante puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón- α (IFN- α), interferón- β (IFN- β), interferón- γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimioquina cutánea atractora de células T (CTACK), quimioquina epitelial expresada en el timo (TECK), quimioquina epitelial asociada a mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, incluyendo IL-15 con delección de la secuencia de señal y que incluye opcionalmente el péptido de señal de IgE. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, o una combinación de los mismos. Preferentemente, los adyuvantes son IL12, IL5, IL28 y RANTES.

Entre otros genes que pueden ser adyuvantes útiles se incluyen los que codifican: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, selectina-L, selectina-P, selectina-E, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento fibroblástico, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento vascular endotelial, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, ligando de RANK, Ox40, ligando de Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

Métodos de administración

En la presente memoria se proporciona un método para la administración de las formulaciones farmacéuticas, preferentemente vacunas, para proporcionar constructos genéticos y proteínas de la proteína GPC de AV, que comprenden epítomos que los convierten en inmunógenos particularmente eficaces contra los que puede inducirse una respuesta inmunitaria contra las infecciones víricas por AV. El método de administración de la vacuna, o vacunación, puede proporcionarse para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica y/o profiláctica. El procedimiento de vacunación puede generar en el mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de virus AV. La vacuna puede administrarse en el individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del mamífero y potenciar la respuesta inmunitaria. La administración de la vacuna puede ser la transfección del antígeno GPC de AV como molécula de ácido nucleico que se expresa en la célula y se administra en la superficie de la célula, que resulta reconocida por el sistema inmunitario e induce una respuesta celular, humoral o celular y humoral. La administración de la vacuna puede utilizarse para inducir o provocar una respuesta inmunitaria en los mamíferos contra una pluralidad de virus AV mediante la administración en los mamíferos de la vacuna comentada en la presente memoria.

Tras la administración de la vacuna en el mamífero, y de esta manera el vector en las células del mamífero, las células transfectadas expresarán y secretarán la proteína GPC de AV. Dichas proteínas secretadas, o antígenos sintéticos, serán reconocidos como foráneos por el sistema inmunitario, que construirá una respuesta inmunitaria que puede incluir: anticuerpos producidos contra los antígenos y una respuesta de células T específicamente contra el antígeno. En algunos ejemplos, un mamífero vacunado con las vacunas comentadas en la presente memoria presentará un sistema inmunitario sensibilizado y al ser retado con una cepa vírica de AV, el sistema inmunitario sensibilizado podrá realizar una rápida eliminación de los virus AV posteriores, sea a través de la inmunidad humoral, celular, o ambas. La vacuna puede administrarse en el individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo, potenciando de esta manera la respuesta inmunitaria.

La vacuna puede administrarse en forma de una vacuna de ADN y los métodos de administración de una vacuna de ADN se describen en las patentes US n° 4.945.050 y n° 5.036.006.

La vacuna puede administrarse en el mamífero para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate no humano, vaca, cerdo, oveja, cabra, antílope, bisonte, búfalo de agua, bóvidos, ciervos, erizos, elefantes, llama, alpaca, ratones, ratas o pollos, y preferentemente ser humano, vaca, cerdo o pollo.

Vías de administración

La vacuna puede administrarse mediante diferentes vías, incluyendo por vía oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosal, tópica, mediante inhalación, mediante administración bucal, intrapleural, intravenosa,

intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratecal e intraarticular, o combinaciones de las mismas. Para la utilización veterinaria, la composición puede administrarse en forma de una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario podrá determinar fácilmente el régimen de administración y la vía de administración que resulten más apropiados para un animal particular. La vacuna puede administrarse mediante jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, "pistolas de bombardeo de microproyectiles" u otros métodos físicos, tales como la electroporación ("EP"), "método hidrodinámico", o ultrasonidos.

El vector de la vacuna puede administrarse en el mamífero mediante varias tecnologías bien conocidas, incluyendo la inyección de ADN (también denominada vacunación de ADN) con y sin electroporación in vivo, mediada por liposomas, facilitada por nanopartículas, vectores recombinantes tales como adenovirus recombinante, virus asociado a adenovirus recombinante y Vaccinia recombinante. El antígeno GPC de AV puede administrarse mediante inyección de ADN y junto con electroporación in vivo.

Electroporación

La administración de la vacuna mediante electroporación de los plásmidos de la vacuna puede llevarse a cabo utilizando dispositivos de electroporación que pueden configurarse para la administración en un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía eficaz para causar la formación de poros reversibles en las membranas celulares, y preferentemente el pulso de energía es una corriente constante similar a una entrada de corriente prefijada por un usuario. El dispositivo de electroporación puede comprender un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o un conjunto de control. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: controlador, generador de forma de onda de corriente, probador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento de información de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación e interruptor de alimentación. La electroporación puede llevarse a cabo utilizando un dispositivo de electroporación in vivo, por ejemplo el sistema de EP CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) o el electroporador Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) a fin de facilitar la transfección de las células por el plásmido. Entre los ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden facilitar la administración de las vacunas de ADN de la presente invención se incluyen los descritos en la patente US nº 7.245.963 de Draghia-Akli et al., publicación de patente US Nº 2005/0052530, presentada por Smith et al. Entre otros dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden utilizarse para facilitar la administración de las vacunas de ADN se incluyen los proporcionados en la solicitud de patente US copendiente y copropietaria nº de serie 11/874072, presentada el 17 de octubre, 2007, que reivindica el beneficio bajo la norma 35 USC 119(e) de las solicitudes provisionales de patente US nº de serie 60/852.149, presentada el 17 de octubre de 2006 y nº 60/978.982, presentada el 10 de octubre de 2007.

La patente US nº 7.245.963 de Draghia-Akli et al. Describe sistemas modulares de electrodos y su utilización para facilitar la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas modulares de electrodos pueden comprender una pluralidad de electrodos de aguja, una aguja hipodérmica, un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor entre un controlador programable de pulsos de corriente constante y la pluralidad de electrodos de aguja, y una fuente de alimentación. Un operador puede coger la pluralidad de electrodos de aguja que están montados sobre una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. A continuación, se administran las biomoléculas mediante la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador programable de pulso de corriente constante se activa y se aplica un pulso eléctrico de corriente constante en la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La publicación de patente US nº 2005/0052630, presentada por Smith et al., describe un dispositivo de electroporación que puede utilizarse para facilitar eficazmente la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") la operación del cual es especificada por software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones programables de pulsos de corriente constante entre electrodos en una matriz basándose en el control del usuario y la introducción de los parámetros del pulso, y permite el almacenamiento y adquisición de los datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación comprende además un electrodo de disco reemplazable que presenta una matriz de electrodos de aguja, un canal central de inyección para una aguja de inyección y un disco guía extraíble.

Las matrices de electrodos y métodos descritos en la patente US nº 78.245.963 y publicación de patente US nº 2005/0052630 pueden adaptarse para la penetración profunda en no sólo tejidos tales como músculos, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para administrar la biomolécula seleccionada) también se inserta por completo en el órgano diana y la inyección se administra perpendicularmente en el tejido diana, en la zona que ha sido predelimitada por los electrodos. Los electrodos descritos en la patente US nº 7.245.936 y en la publicación de patente US nº 2005/005263 preferentemente son de 20 mm de longitud y calibre 21.

Adicionalmente, se encuentra contemplado en algunas realizaciones que incorporan dispositivos de electroporación y usos de los mismos, existen dispositivos de electroporación que son los descritos en las patentes siguientes: Patente

US nº 5.273.525, publicada el 28 de diciembre, 1993, las patentes US nº 6.110.161, publicada el 29 de agosto, 2000, nº 6.261.281, publicada el 17 de julio, 2001, y nº 6.958.060, publicada el 25 de octubre, 2005, y la patente US nº 6.939.862, publicada el 6 de septiembre, 2005. Además, las patentes que cubren la materia objeto proporcionada en la patente US nº 6.697.669, publicada el 24 de febrero, 2004, que se refiere a la administración de ADN utilizando cualquiera de entre una diversidad de dispositivos y la patente US nº 7.328.064, publicada el 5 de febrero, 2008, referida a un método de inyección de ADN, se encuentran contempladas en la presente memoria.

Método de preparación de vacuna

Los métodos para preparar los plásmidos de ADN de la invención que comprenden las vacunas de ADN se comentan en la presente memoria. Los plásmidos de ADN, tras la etapa final de subclonación en el plásmido de expresión de mamífero, pueden utilizarse para inocular un cultivo celular en un tanque de fermentación a gran escala, utilizando métodos conocidos de la técnica.

Los plásmidos de ADN de la invención pueden ser para la utilización con los dispositivos de EP de la presente exposición y pueden formularse o fabricarse utilizando una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, aunque preferentemente se fabrican utilizando una técnica de fabricación de plásmido optimizada que se describe en la solicitud publicada de patente US nº 20090004716, que se presentó el 23 de mayo de 2007. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en dichos estudios pueden formularse a concentraciones superiores o iguales a 10 mg/ml. Las técnicas de fabricación incluyen o incorporan además diversos dispositivos y protocolos que son comúnmente conocidos por el experto ordinario en la materia, además de las descritas en el documento nº de serie US 60/939792, incluyendo los descritos en la patente objeto de licencia US nº 7.238.522, publicada el 3 de julio, 2007.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente en los Ejemplos a continuación. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se proporciona exclusivamente a título ilustrativo.

Estudio animal - Cobaya Se dividieron cobayas de cepa 13 (*Cavia porcellus*) en 4 grupos de 6 animales cada grupo (estudio piloto) o en 7 grupos de 8 o 5 animales cada grupo (estudio de seguimiento). Los animales fueron anestesiados y después se les administró ADN auténtico (vacunación con VLAS-GPC, con SEC ID nº 1 (optimizado), con SEC ID nº 3 (no optimizado) o simulada (plásmido vacío) de 12 µg (pistola génica o GG, por sus siglas en inglés) o 100 µg (dispositivo de electroporación por vía intramuscular (EP IM), dispositivo intradérmico mínimamente invasivo (MID) o dispositivo no invasivo (NINV)) a intervalos de 3 semanas. Cuatro semanas después de la vacunación final, se llevaron a cabo infecciones víricas bajo condiciones de nivel de bioseguridad (BSL)-4. Se administró en cada animal una única dosis s.c. de 1000 ufp de VLAS. Los animales se observaron diariamente para progresión de la enfermedad. Se extrajeron muestras de sangre los días -7 o 0, 7, 14, 21 y 29 o 32 después de la infección. Los animales fueron eutanizados cuando ya estaban moribundos. Se analizaron muestras de suero para viremia y valores de química sanguínea. Se llevaron a cabo necropsias en cada animal, y se analizaron los tejidos para análisis histopatológico e inmunohistoquímico específico del VLAS.

Estudio animal - primate no humano Se dividieron macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) en 2 grupos de 4 animales cada grupo. Los animales fueron anestesiados y después se les administró una vacunación auténtica o simulada de 1 mg de ADN (SEC ID nº 2) a intervalos de 3 semanas. Cuatro semanas después de la vacunación final, se llevaron a cabo infecciones víricas bajo condiciones BSL-4. Se administró en cada animal una única dosis i.m. de 1000 pfu de VLAS. Los animales se observaron diariamente para progresión de la enfermedad. Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 3, 6, 10, 14, 21 y 28 y 45 después de la infección. Los animales fueron eutanizados cuando ya estaban moribundos. Se analizaron las muestras de sangre para CBC, química sanguínea y viremia sérica.

Análisis de viremia Se adsorbieron células Vero, sembradas en placas de cultivo celular de 6 pocillos, bajo rotación suave a 37°C, con 5% de CO₂ con diluciones en serie de 10 veces de suero durante 1 h, después se aplicó en cada pocillo una capa de agarosa al 0,8% en EBME con suero de feto bovino al 10%. A continuación, se incubaron las células a 37°C, 5% de CO₂ durante 4 días, y después se tiñeron con rojo neutro (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se contaron las placas y se registraron.

Análisis de química sanguínea Se analizaron muestras de suero de primate para GLU, CRE, UA, CA, ALB, TP, ALT, AST, (ALP), TBIL, GGT y AMY mediante el rotor de 13 paneles de Química general en un analizador de química sanguínea Piccolo de Abaxis). Se analizaron muestras de cobaya para el panel metabólico integral mediante un analizador de química sanguínea VetScan de Abaxis.

Recuentos sanguíneos completos Para el estudio de primates, se analizó un volumen aproximado de 25 µl de sangre-EDTA completa en un instrumento Hemavet (Drew Scientific).

Análisis patológico de tejidos Los tejidos se incluyeron en parafina, se realizaron secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se llevó a cabo la inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico del VLAS y un kit disponible comercialmente (sistema Envision, DAKO, Carpinteria, CA). Los tejidos fueron desparafinizados,

bloqueados y después incubados con anticuerpo primario y anticuerpos secundarios, y después se contratiñeron con hematoxilina.

Análisis patológico de tejidos Los tejidos se incluyeron en parafina, se realizaron secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se llevó a cabo la inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico del VLAS y un kit disponible comercialmente (sistema Envision, DAKO, Carpinteria, CA). Los tejidos fueron desparafinizados, bloqueados y después incubados con anticuerpo primario y anticuerpos secundarios, y después se contratiñeron con hematoxilina.

Generación de ADN del VLAS

SE generó una vacuna de ADN del VLAS mediante clonación del ADNc codificante del gen de precursor de glucoproteína (GPC) del VLAS (cepa Josiah) en el vector plásmido pWRG7077 tal como se ha descrito anteriormente (Schmaljohn et al., J. Vir. 71, 9563-9569 (1997)). El gen de VLAS-GPC se clonó en el sitio de restricción NotI/BglII. La expresión se encontraba bajo el control del promotor de CMV.

La eficacia protectora de la vacuna se sometió a ensayo mediante administración intramuscular (IM) de EP y reto de los cobayas, que desarrollan una enfermedad hemorrágica similar a la observada en primates no humanos (NHP) y seres humanos. Los cobayas (6 en cada grupo) recibieron 50 µg de la vacuna de ADN (que comprendía SEC ID nº 3) tres veces a intervalos de 3 a 4 semanas mediante EP intramuscular (IM) o ~5 µg mediante pistola génica (GG). Aproximadamente 4 semanas después de la vacunación, los cobayas fueron retados mediante la administración intraperitoneal (IP) de 1000 unidades formadoras de placa (ufp) de VLAS, una dosis de reto letal estándar. Todos los cobayas sucumbieron a la infección por VLAS, mientras que el 83% de los animales vacunados sobrevivieron y el único animal que murió mostró un retardo en el tiempo hasta la muerte. Se detectaron anticuerpos neutralizadores de VLAS después del reto en los cobayas vacunados pero no en los cobayas de control, indicando que se había inducido una respuesta de sensibilización con la vacuna de ADN (datos no mostrados).

Aunque este estudio con cobayas demuestra que la EP IM con la vacuna de ADN de VLAS podía inducir inmunidad protectora, los animales retados desarrollaron fiebres y mostraron signos clínicos leves de enfermedad (fig. 1A, 1C); de esta manera, se buscaron mejoras adicionales del constructo de vacuna y de los métodos de administración intradérmica. Con este objetivo, la vacuna de ADN de VLAS-GPC se optimizó para maximizar la disponibilidad de los codones de mamífero y para eliminar los elementos víricos que se ha demostrado que comprometen la expresión. Esta vacuna optimizada (que comprendía SEC ID nº 1) se sometió a ensayo en cobayas de Cepa 13 (8 en cada grupo), que fueron vacunados con 50 µg de ADN tres veces a intervalos de 3-4 semanas utilizando un dispositivo de electroporación intramuscular (EP IM) con parámetros revisados, con el dispositivo intradérmico mínimamente invasivo (MID) o el dispositivo no invasivo (NINV). El (MID) presenta un espaciado de los electrodos de forma triangular con 3 mm de separación entre electrodos en un lado y 5 mm de separación de los electrodos en dos otros lados. El NINV presenta una matriz de electrodos en un patrón 4x4 que entran en contacto con la superficie de la piel sin penetrar en ella (o, alternativamente, penetrando en la piel hasta el estrato córneo).

Tras el reto, todos los cobayas vacunados con el plásmido vacío o los que no habían recibido vacuna, se volvieron febriles, mostraron signos de enfermedad, perdieron peso y sucumbieron a la infección 1, 5 y 18 días después del reto (fig. 1). En contraste, todos los cobayas vacunados con la vacuna de ADN de VLAS con codones optimizados mediante cualquiera de los métodos de EP sobrevivieron al reto. Al contrario que el estudio piloto, en el que los cobayas vacunados con la vacuna de ADN de VLAS no optimizada mostraron signos de enfermedad; en el presente estudio, los cobayas en los grupos de EP tanto MID como IM no mostraron signos de enfermedad, se mantuvieron afebriles y mantuvieron pesos corporales constantes. Sin embargo, se observaron signos leves de enfermedad en algunos de los cobayas que habían recibido la vacuna de ADN de VLAS mediante EP IM, incluyendo fiebres bajas y ligeras viremias, sugiriendo que la electroporación dérmica había resultado más eficaz en el presente estudio.

La figura 2 muestra las curvas de supervivencia de cobayas (8 en cada grupo) vacunados con ADN de VLAS de codones optimizados o con un control de plásmido vacío utilizando dispositivos de EP IM o MID. Los cobayas fueron retados con 1000 ufp de VLAS 4 semanas después de la última vacunación.

Con el fin de confirmar la eficacia y durabilidad de la vacuna y método de administración, se seleccionó un subgrupo de cobayas vacunados con EP MID para un experimento de reto retrospectivo. Estos cobayas fueron mantenidos en contención de nivel BSL-4 durante 120 días y después fueron retados, junto con 4 cobayas no expuestos de pesos equivalentes, con 1000 ufp de VLAS. Los cobayas se observaron diariamente durante 30 días tras la infección vírica y se monitorizaron para peso, temperatura y progresión de la enfermedad. Los animales vacunados no enfermaron durante el estudio y sobrevivieron a la reinfección (fig. 3).

La figura 3 muestra los resultados de un experimento de reto retrospectivo de un subgrupo de cobayas vacunados mediante EP MID en donde la fig. 3 muestra los cambios de peso corporal del grupo y la fig. 3B muestra los cambios de temperatura corporal media de los grupos.

La vacuna de ADN de VLAS de codones optimizados (que comprendía SEC ID nº 2) administrada mediante EP MID

en NHP fue evaluada adicionalmente. El modelo NHP es el modelo más informativo para la evaluación de la eficacia vacunal debido a que la enfermedad observada en estos animales simula más estrechamente la enfermedad en el ser humano.

Se vacunaron grupos de cuatro NHP utilizando el dispositivo de EP MID con 1 mg de vacuna de ADN de VLAS (que comprendía SEC ID nº 2) o 1 mg de vector plásmido vacío tres veces a intervalos de 3 semanas y se retaron mediante inyección IM de 1000 ufp de VLAS 4 semanas después de la vacunación final. Las muestras de sangre recogidas de los NHP se monitorizaron para CBC y química sanguínea y los animales fueron observados dos veces al día para progresión de la enfermedad. Dos de los cuatro NHP de control sucumbieron a enfermedad durante la ventana hemorrágica (días 13 y 17 después de la infección). Los otros dos NHP de control desarrollaron síntomas neurológicos, incluyendo ataxia y sordera, tal como indica la comparación de sus audiogramas generados el día final del estudio (45 días después del reto) con los NHP vacunados con ADN de VLAS (fig. 4). La sordera (unilateral o bilateral) es una consecuencia bien reconocida de la infección por VLAS que se produce en aproximadamente 30% de los pacientes de VLAS, aunque, según el conocimiento del que disponen los presentes inventores, ésta es la primera documentación de esta consecuencia de la enfermedad en NHP, y podría servir de marcador de la enfermedad.

Tal como se muestra en la figura 4, los audiogramas para NHP nº 2 y NHP nº 7, respectivamente, se vacunaron con plásmido vacío o la vacuna de ADN de VLAS. Los audiogramas de ambos monos con un estímulo de 0 decibelios no mostraron respuesta. Los audiogramas para los oídos izquierdo y derecho de NHP nº 2 no mostraron respuesta a 75 decibelios, en contraste con los audiogramas de NHP nº 7, que mostraban patrones de respuesta de audición.

Aunque dos de los NHP de control sobrevivieron a la infección, se mantuvieron críticamente enfermos durante todo el estudio (día 45 después de la infección). En contraste, los cuatro NHP vacunados con ADN de VLAS presentaron una apariencia saludable, no eran febriles en ningún momento y mantuvieron CBC y químicas sanguíneas normales (fig. 5).

La figura 5 muestra las puntuaciones de supervivencia, viremia y morbilidad de los NHP vacunados con la vacuna de ADN de VLAS o plásmido vacío mediante EP MID y retados con VLAS. La figura 5A muestra que todos los NHP vacunados con ADN de VLAS sobrevivieron al reto de VLAS, mientras que 2 o 4 NHP de control vacunados con plásmido vacío sucumbieron a la infección. La figura 5B muestra que los 4 NHP vacunados con plásmido vacío se volvieron virémicos, aunque los 2 NHP supervivientes habían eliminado el virus 28 días después del reto. Los NHP vacunados con ADN de VLAS eran avirémicos en todos los puntos temporales. C. La puntuación de morbilidad es una medida del grado de enfermedad de los NHP durante el estudio. Los animales de control enfermaron críticamente antes de morir. Los 2 NHP que no murieron permanecieron crónicamente enfermos hasta el final del estudio, no volviendo a la condición previa al reto. Los NHP vacunados con ADN de VLAS no enfermaron en ningún momento.

La figura 6 muestra valores hematológicos seleccionados para Cynomolgus que recibieron la vacuna de ADN de VLAS-GPC (que comprendía la SEC ID nº 2) o la vacuna de ADN simulada.

La figura 7 muestra CBC y químicas sanguíneas de Cynomolgus vacunados (NHP), tanto vacunados con vacuna de ADN de VLAS-GPC (que comprendía la SEC ID nº 2) como los vacunados con la vacuna de ADN simulada. Los resultados mostrados demuestran que el CBC y la química sanguínea eran normales en los NHP.

Experimentos y métodos

Realización de estudio de intervalos de dosis de vacuna de ADN de VLAS (meses 1 a 8):

Se evaluaron tres dosis de vacuna de ADN de VLAS en cobayas de Cepa 13. En estudios anteriores, tres vacunaciones de 50 µg de vacuna de ADN de VLAS mediante EP MID a intervalos de 3 semanas proporcionaron inmunidad protectora completa a cobayas de Cepa 13. Se comparó la eficacia protectora de las vacunas en un régimen acortado (dos vacunaciones administradas separadas por 3 semanas) de dosis de 50 µg, 5 µg y 1 µg administradas mediante EP MID (Tabla 1).

Tabla 1

Evaluación de los intervalos de dosis de la vacuna de ADN de VLAS de codones optimizados administrada mediante electroporación intradérmica en cobayas de Cepa 13					
Grupo	Vacuna de ADN	Dosis	Nº de cobayas	Programa de vacunación	Virus de reto
1	VLAS	50 µg	8	0, 4 semanas	VLAS
2	VLAS	5 µg	8	0, 4 semanas	VLAS
3	VLAS	1 µg	8	0, 4 semanas	VLAS
4	Vector vacío	50 µg	8	0, 4 semanas	VLAS
Total=			32		

Determinación de la protección cruzada de vacunas de ADN de JUNV y MACV y medición de la interferencia de la formulación de vacuna multiagente

La aplicabilidad global del sistema de electroporación dérmica de la vacuna e ADN como plataforma de vacuna multiagente se sometió a ensayo. Se generaron vacunas de ADN de codones optimizados para JUNV y MACV (que comparten una homología de aminoácidos de GPC de aproximadamente 96%) y se llevó a cabo un estudio de reto cruzado (Tabla 2). Tras determinar que las vacunas de JUNV y MACV proporcionan protección cruzada, los estudios futuros con el objetivo de proteger frente a arenavirus del viejo mundo y del nuevo mundo pueden utilizar únicamente una de las dos vacunas en combinación con la vacuna de VLAS. Se vacunó un grupo de cobayas en el presente estudio con la totalidad de las tres vacunas de ADN candidatas y se retaron con VLAS.

Tabla 2

Estudio piloto para evaluar: (1) la protección cruzada de las vacunas de ADN de codones optimizados de JUNV y MACV, y (2) el potencial multiagente de la plataforma de vacuna.					
Grupo	Vacuna de ADN	Dosis	Nº de cobayas	Programa de vacunación	Virus de reto
1	JUNV	75 µg	8	0, 4 semanas	JUNV
2	JUNV	75 µg	8	0, 4 semanas	VCAM
3	VCAM	75 µg	8	0, 4 semanas	VCAM
4	VCAM	75 µg	8	0, 4 semanas	JUNV
5	Vector vacío	75 µg	8	0, 4 semanas	JUNV
6	Vector vacío	75 µg	8	0, 4 semanas	VCAM
7	LASV, JUNV, MACV	25 µg cada uno	8	0, 4 semanas	VLAS
8	Vector vacío	75 µg	8	0, 4 semanas	VLAS
	Total=		64		

Medición de los correlatos inmunitarios, reducción de dosis y adyuvantes de citoquina en el modelo de reto de NHP

Se llevaron a cabo estudios para medir las respuestas inmunitarias de primates no humanos (NHP) vacunados con la vacuna de ADN de VLAS (que comprendía SEC ID nº 2) mediante EP, con y sin adyuvantes de citoquina (ver la lista en la Tabla 3, posteriormente). Tras la vacunación, el NHP se retó en un laboratorio de contención de nivel BSL-4.

Se sometieron a ensayo dos plásmidos de ADN de citoquina en combinación con la vacuna de ADN de VLAS: IL-28 e IL-12:

Los NHP vacunados tres veces a intervalos de 3 semanas con 1 mg de vacuna de ADN de VLAS (que comprendía SEC ID nº 2) se ha demostrado en estudios anteriores que estaban protegidos del reto con VLAS. Se llevaron a cabo estudios que comparaban la dosis de 1 mg de la vacuna administrada tres veces a intervalos de 4 semanas con la misma dosis administrada dos veces separadas por 8 semanas. Además, se comparó una dosis de la mitad de concentración de la vacuna (0,5 mg) administrada sola o en combinación con plásmidos que expresaban los genes de las citoquinas IL-12 o IL-28. Dichas citoquinas están destinadas a ser adyuvantes de la vacuna y proporcionar respuestas inmunitarias celulares mejoradas.

Los fenotipos inmunitarios celulares inducidos por la vacuna de VLAS y los adyuvantes de citoquina se evaluaron mediante los análisis siguientes: ELISPOT de IFNγ específico de antígeno, tinción de citoquinas intracelular (incluyendo el ensayo para perfiles de células T polifuncionales), proliferación mediante dilución de CFSE, y tinción para marcadores de células T CD8 citolíticas, incluyendo la expresión de Tbet, Perforina, granzima B y CD107a, tal como se indica en Hersperger et al., 2010a; Hersperger et al., 2010b; Morrow et al., 2010b y Migueles et al., 2008. La combinación de dichos inmunoensayos permite interrogar específicamente sobre la respuesta de las células T CD8+ a la vacuna de ADN de VLAS, con especial énfasis en el fenotipo y actividad de las CTL (linfocitos citotóxicos, por sus siglas en inglés), ya que esta función de las células T CD8+ se correlaciona directamente con la eliminación de las células infectadas por virus y constituye un mecanismo importante por el que el sistema inmunitario controla y elimina la infección vírica. Los estudios anteriores utilizando IL-12 e IL-28 sugieren que ambos adyuvantes son capaces de fomentar la inducción de las CTL específicas de vacuna, que mostraron incrementos robustos de la liberación de perforina, carga y liberación de granzima B y expresión de CD107a. Dicho estudio se llevó a cabo en un modelo de NHP utilizando antígenos del VIH además de adyuvante, y estas respuestas incrementadas se observaron tanto en PBMC como en células T recolectadas de ganglios linfáticos mesentéricos, sugiriendo que dichos adyuvantes ejercen una influencia sobre la sangre periférica además de sobre órganos linfoides secundarios. Además, tanto IL-12 como IL-28 pudieron ejercer su influencia sobre los fenotipos y función de las CTL a largo plazo, ya que el análisis realizado 3 meses después de la inmunización final mostró la presencia continuada de respuestas inmunitarias específicas de antígeno incrementadas.

Tabla 3

Administración en NHP con y sin adyuvantes IL-12 o IL-28					
Grupo	Vacunas de ADN	Dosis	nº de NHP	Programa de vacunación	Virus de reto
1	VLAS	1 mg	4	0, 4, 8 semanas	VLAS
2	VLAS	1 mg	4	0, 8 semanas	VLAS
3	VLAS	0,5 mg	4	0, 8 semanas	VLAS
4	VLAS+IL-28	0,5 mg cada uno	4	0, 8 semanas	VLAS
5	VLAS+IL-12	0,5 mg cada uno	4	0, 8 semanas	VLAS
5	Vector vacío	1 mg	4	0, 8 semanas	VLAS
	Total=		24		

Desarrollo del ensayo de potencia para la vacuna de ADN de VLAS

Para permitir la solicitud de nuevo fármaco investigacional (NFI) se requiere un ensayo de potencia robusto y fiable. Debe utilizarse un ensayo de potencia de ensayo de citometría de flujo cuantitativo para las vacunas de AV, por ejemplo la vacuna de ADN de VLAS. Ya se han desarrollado ensayos similares y se han utilizado durante más de tres años en USAMRIID en apoyo de un estudio clínico de Fase 1 de una vacuna de ADN para fiebre hemorrágica con síndrome renal causado por infecciones por hantavirus (Badger et al., 2011) y para apoyar la solicitud de NFI de una vacuna de ADN para el virus de la encefalitis equina venezolana. En general, el método implica transfectar células con ADN de ensayo y comparar la expresión de antígeno medida con la generada con la expresión a partir de cantidades conocidas de ADN de material de referencia.

El ensayo es rápido (menos de un día) altamente reproducible y ya se ha adaptado para el rendimiento según directrices de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). En consecuencia, los documentos y procedimientos reguladores ya se encuentran en vigor. Ello debería facilitar en gran medida la adaptación del ensayo a la medición de la potencia de la vacuna de ADN del VLAS. Aunque dicho ensayo por sí solo no resulta suficiente para medir la potencia y estabilidad de la vacuna de ADN, debido a que existen pocos correlatos de inmunidad protectora para la infección por VLAS, los presentes inventores también vacunarán grupos pequeños de cobayas en cada punto temporal de estabilidad durante el primer año para proporcionar información que correlaciona la expresión génica con la antigenicidad.

El modelo de reto de cobayas es un modelo aceptado para la evaluación de la eficacia de vacunas de AV. Los animales fueron vacunados 3x a intervalos de 3-4 semanas con 50 µg de vacuna de ADN de GPC del VLAS utilizando el dispositivo MID. Los animales fueron retados mediante inyección i.m. con 1000 ufp de VLAS tres semanas después de la última vacunación. Tal como se muestra en la fig. 2, más de 90% de los animales vacunados sobrevivieron al reto, mientras que 100% de los animales de control (vacunación simulada) murieron llegado el día 15 después del reto. La fig. 5 muestra datos de reto del estudio de NHP. Se vacunaron grupos de 4 NHP con 1 mg de vacuna de ADN de GPC del VLAS o 1 mg de vector vacío 3x a intervalos de 3 semanas y retados mediante inyección i.m. de 1000 ufp de VLAS 4 semanas después de la vacunación final. 4/4 de los NHP vacunados sobrevivieron y no mostraron signos de viremia, mientras que 4/4 de los animales de control desarrollaron viremia y 2/4 sucumbieron al reto.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INOVIO PHARMACEUTICALS, INC.
 BRODERICK, Kate
 SARDESAI, Niranjana Y
 CASHMAN, Kathleen A
 SCHMALJOHN, Connie S

<120> VACUNAS DE ARENAVIRUS DE PROTECCIÓN CRUZADA Y MÉTODO DE UTILIZACIÓN DE LAS MISMAS

<130> VGX0125

<150> US 61/506579
 <151> 2011-07-11

<150> US 61/507062
 <151> 2011-07-12

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 758 713 T3

<210> 1
<211> 1476
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> GP de VLASV Josiah

<400> 1
atggggccaga tcgtgacctt cttccaggaa gtcccccacg tcatcgagga agtcatgaac 60
atcgtcctga tcgccctgtc cgtgctggcc gtgctgaagg gcctgtacaa cttcgccacc 120
tgtggcctgg tcggactggt caccttctctg ctgctgtgcg gccggtcctg caccacctcc 180
ctgtacaagg gcgtgtacga gctgcagacc ctggaactga acatggaaac cctgaacatg 240
accatgcccc tgagctgcac caagaacaac tcccaccact acatcatggt cggcaacgag 300
accggactgg aactgacctt gaccaacacc tccatcatca accacaagtt ctgcaacctg 360
tccgacgccc acaagaagaa cctgtacgac cagccctga tgtccatcat ctccaccttc 420
cacctgtcca tccccaaactt caaccagtac gaggccatgt cctgcgactt caacggcggc 480
aagatcagcg tgcagtacaa cctgtccac tccacgccc gcgacgccc caaccactgc 540
ggcaccgtgg ccaacggcgt gctgcagacc ttcatgcca tggcctgggg cggtcctac 600
atgccctgg actccggcag gggcaactgg gactgcatca tgaccagcta ccagtacctg 660
atcatccaga acaccacctg ggaggaccac tgccagttct cccgcccctc ccccatcggc 720
tacctggggc tgctgtccca gcgcacccgc gacatctaca tctcccgag gctgctgggc 780
accttcacct ggacctgtc cgactccgag ggcaaggaca cccctggcgg ctactgcctg 840
accgctgga tgctgatcga ggccgagctg aagtgtctcg gcaacaccgc cgtggccaag 900
tgcaacgaga agcacgacga ggaattctgc gacatgctgc gcctgttcga cttcaacaag 960
caggccatcc agcgcctgaa ggccgaggcc cagatgtcta tccagctgat caacaaggcc 1020
gtgaacgccc tgatcaacga tcagctcatc atgaagaacc acctgaggga catcatgggc 1080
atcccttact gcaactactc caagtactgg tatctgaacc acaccaccac cggccgcacc 1140
tcctgcccga agtgtgggtt ggtgtccaac ggctcctacc tgaacgagac ccacttctcc 1200
gacgacatcg agcagcaggc cgacaacatg atcaccgaga tgctgcagaa agaatacatg 1260
gaacgccaag gcaagacacc actgggcctg gtggacctgt tcgtgttctc cacctccttc 1320
tacctgatct ccatcttctt gcacctggtc aagatcccca cccaccgcca catcgtgggc 1380
aagtcctgcc ccaagcccca caggctgaac cacatgggca tctgcagctg cggactgtac 1440
aagcagcccg gcgtgcccgt gaagtgaag cgctga 1476

10

<210> 2
<211> 1476
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> NHP de VLAS Josiah

20

ES 2 758 713 T3

<400> 2
atgggccaga tcgtgacctt ttttcaggaa gtgccccacg tcatcgagga agtgaatgaac 60
atcgtcctga tcgccctgag cgtgctggcc gtgctgaagg gcctgtacaa ttttgccaca 120
tgcggcctgg tcggactggt cacatctctg ctgctgtgcg gcagaagctg cacaacaagc 180
ctgtacaagg gcgtgtacga gctgcagaca ctggaactga acatggaaac cctgaacatg 240
acaatgccac tgagctgcac caagaataac agccaccact acatcatggt cggcaatgag 300
acaggcctgg aactgacact gaccaacacc agcatcatca accacaagtt ctgcaatctg 360
agcgacgccc acaagaagaa tctgtacgac cagccctga tgagcatcat cagcaccttt 420
cacctgagca tccccaaact taatcagtag gaggccatga gctgcgactt taatggcggc 480
aagatcagcg tgcagtacaa tctgagccac agctacgccc gcgacgccc caatcactgc 540
ggcacagtgg ccaatggcgt gctgcagacc tttatgagaa tggcctgggg cggcagctat 600
atgccctgg atagcggcag aggcaattgg gattgcatca tgaccagcta ccagtacctg 660
atcatccaga atacaacctg ggaggaccac tgccagtta gcagaccaag cccaatcggc 720
tacctgggccc tgctgtccca gagaacaagg gacatctaca tcagcagaag gctgctgggc 780
acctttacat ggacactgag cgatagcgag ggcaaggata caccaggcgg ctactgcctg 840
acaagatgga tgctgatcga ggccgagctg aagtgtcttg gcaatacagc cgtggccaag 900
tgcaatgaga agcacgacga ggaattctgc gatatgctga ggctgttcga ctttaacaag 960
caggccatcc agagactgaa ggccgaggcc cagatgtcca tccagctgat caataaggcc 1020
gtgaacgccc tgatcaatga ccagctgatc atgaagaacc acctgagaga catcatgggc 1080
atccatact gcaactacag caagtactgg tatctgaacc acacaacaac aggcagaaca 1140
agcctgccaa agtgctgggt ggtgtccaat ggcagctacc tgaacgagac acactttagc 1200
gacgatatcg agcagcaggc cgacaatatg atcacagaga tgctgcagaa agaatacatg 1260
gaaaggcagg gcaagacacc actgggcctg gtggatctgt ttgtgttcag caccagcttc 1320
tacctgatca gcatctttct gcacctgggc aagatccaa cacacagaca catcgtgggc 1380
aagagctgcc caaagccaca cagactgaac cacatgggca tctgcagctg cggcctgtat 1440
aagcagccag gcgtgccagt gaagtgaag agatga 1476

5

<210> 3
<211> 1476
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> gfp2 de VLAS ref

ES 2 758 713 T3

<400> 3
atgggacaaa tagtgacatt cttccaggaa gtgcctcatg taatagaaga ggtgatgaac 60
attgttctca ttgcactgtc tgtactagca gtgctgaaag gtctgtacaa ttttgcaacg 120
tgtggccttg ttggtttggt cactttcctc ctgttgtgtg gtaggtcttg cacaaccagt 180
ctttataaaag gggtttatga gcttcagact ctggaactaa acatggagac actcaatatg 240
accatgcctc tctcctgcac aaagaacaac agtcatcatt atataatggt gggcaatgag 300
acaggactag aactgagctt gaccaacacg agcattatta atcacaaatt ttgcaatctg 360
tctgatgccc aaaaaagaa cctctatgac cagcctctta tgagcataat ctcaactttc 420
cacttgtcca tccccaaactt caatcagtat gaggcaatga gctgcgattt taatggggga 480
aagattagtg tgcagtacaa cctgagtcac agctatgctg gggatgcagc caaccattgt 540
ggtactgttg caaatggtgt gttacagact tttatgagga tggcttgggg tgggagctac 600
attgctcttg actcaggccg tggcaactgg gactgtatta tgactagtta tcaatatctg 660
ataatccaaa atacaacctg ggaagatcac tgccaattct cgagaccatc tcccatcggg 720
tatctcgggc tcctctcaca aaggactaga gatatttata ttagtagaag attgctaggc 780
acattcacat ggacactgtc agattctgaa ggtaaagaca caccaggggg atattgtctg 840
accaggtgga tgctaattga ggctgaacta aaatgcttcg ggaacacagc tgtggcaaaa 900
tgtaatgaga agcatgatga ggaattttgt gacatgctga ggctgtttga cttcaacaaa 960
caagccattc aaaggttgaa agctgaagca caaatgagca ttcagttgat caacaaagca 1020
gtaaatgctt tgataaatga ccaacttata atgaagaacc atctacggga catcatggga 1080
attccatact gtaattacag caagtattgg tacctcaacc acacaactac tgggagaaca 1140
tactgccc aatgttggct tgtatcaa atgttcatact tgaacgagac ccacttttct 1200
gatgatattg aacaacaagc tgacaatatg atcactgaga tgttacagaa ggagtatatg 1260
gagaggcag ggaagacacc attgggtcta gttgacctct ttgtgttcag tacaagtttc 1320
tatcttatta gcatcttctc tcacctagtc aaaataccaa ctcataggca tattgtaggc 1380
aagtcgtgtc ccaaacctca cagattgaat catatgggca tttgttctctg tggactctac 1440
aaacagcctg gtgtgcctgt gaaatggaag agatga 1476

5

<210> 4
<211> 491
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> GP de VLAS Josiah (aminoácidos)

ES 2 758 713 T3

<400> 4

Met	Gly	Gln	Ile	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Glu	Val	Pro	His	Val	Ile	Glu
1				5					10					15	
Glu	Val	Met	Asn	Ile	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Val	Leu
			20					25					30		
Lys	Gly	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ala	Thr	Cys	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Thr
		35					40					45			
Phe	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Arg	Ser	Cys	Thr	Thr	Ser	Leu	Tyr	Lys	Gly
	50					55					60				
Val	Tyr	Glu	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Asn	Met	Glu	Thr	Leu	Asn	Met
65					70					75				80	
Thr	Met	Pro	Leu	Ser	Cys	Thr	Lys	Asn	Asn	Ser	His	His	Tyr	Ile	Met
				85					90					95	
Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile
			100					105					110		
Ile	Asn	His	Lys	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	His	Lys	Lys	Asn	Leu
		115					120					125			
Tyr	Asp	His	Ala	Leu	Met	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Phe	His	Leu	Ser	Ile
	130					135					140				
Pro	Asn	Phe	Asn	Gln	Tyr	Glu	Ala	Met	Ser	Cys	Asp	Phe	Asn	Gly	Gly
145					150					155					160

ES 2 758 713 T3

Lys Ile Ser Val Gln Tyr Asn Leu Ser His Ser Tyr Ala Gly Asp Ala
 165 170 175
 Ala Asn His Cys Gly Thr Val Ala Asn Gly Val Leu Gln Thr Phe Met
 180 185 190
 Arg Met Ala Trp Gly Gly Ser Tyr Ile Ala Leu Asp Ser Gly Arg Gly
 195 200 205
 Asn Trp Asp Cys Ile Met Thr Ser Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn
 210 215 220
 Thr Thr Trp Glu Asp His Cys Gln Phe Ser Arg Pro Ser Pro Ile Gly
 225 230 235 240
 Tyr Leu Gly Leu Leu Ser Gln Arg Thr Arg Asp Ile Tyr Ile Ser Arg
 245 250 255
 Arg Leu Leu Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu Ser Asp Ser Glu Gly Lys
 260 265 270
 Asp Thr Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Arg Trp Met Leu Ile Glu Ala
 275 280 285
 Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val Ala Lys Cys Asn Glu Lys
 290 295 300
 His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg Leu Phe Asp Phe Asn Lys
 305 310 315 320
 Gln Ala Ile Gln Arg Leu Lys Ala Glu Ala Gln Met Ser Ile Gln Leu
 325 330 335
 Ile Asn Lys Ala Val Asn Ala Leu Ile Asn Asp Gln Leu Ile Met Lys
 340 345 350
 Asn His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys
 355 360 365
 Tyr Trp Tyr Leu Asn His Thr Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Pro Lys
 370 375 380
 Cys Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Ser
 385 390 395 400
 Asp Asp Ile Glu Gln Gln Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Gln
 405 410 415

ES 2 758 713 T3

Lys Glu Tyr Met Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Leu Gly Leu Val Asp
420 425 430

Leu Phe Val Phe Ser Thr Ser Phe Tyr Leu Ile Ser Ile Phe Leu His
435 440 445

Leu Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile Val Gly Lys Ser Cys Pro
450 455 460

Lys Pro His Arg Leu Asn His Met Gly Ile Cys Ser Trp Gly Leu Tyr
465 470 475 480

Lys Gln Pro Gly Val Pro Val Lys Trp Lys Arg
485 490

<210> 5

<211> 491

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NHP de VLAS Josiah (aminoácidos)

<400> 5

Met Gly Gln Ile Val Thr Phe Phe Gln Glu Val Pro His Val Ile Glu
1 5 10 15

Glu Val Met Asn Ile Val Leu Ile Ala Leu Ser Val Leu Ala Val Leu
20 25 30

Lys Gly Leu Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Leu Val Gly Leu Val Thr
35 40 45

Phe Leu Leu Leu Cys Gly Arg Ser Cys Thr Thr Ser Leu Tyr Lys Gly
50 55 60

Val Tyr Glu Leu Gln Thr Leu Glu Leu Asn Met Glu Thr Leu Asn Met
65 70 75 80

Thr Met Pro Leu Ser Cys Thr Lys Asn Asn Ser His His Tyr Ile Met
85 90 95

Val Gly Asn Glu Thr Gly Leu Glu Leu Thr Leu Thr Asn Thr Ser Ile
100 105 110

Ile Asn His Lys Phe Cys Asn Leu Ser Asp Ala His Lys Lys Asn Leu
115 120 125

ES 2 758 713 T3

Tyr Asp His Ala Leu Met Ser Ile Ile Ser Thr Phe His Leu Ser Ile
 130 135 140
 Pro Asn Phe Asn Gln Tyr Glu Ala Met Ser Cys Asp Phe Asn Gly Gly
 145 150 155 160
 Lys Ile Ser Val Gln Tyr Asn Leu Ser His Ser Tyr Ala Gly Asp Ala
 165 170 175
 Ala Asn His Cys Gly Thr Val Ala Asn Gly Val Leu Gln Thr Phe Met
 180 185 190
 Arg Met Ala Trp Gly Gly Ser Tyr Ile Ala Leu Asp Ser Gly Arg Gly
 195 200 205
 Asn Trp Asp Cys Ile Met Thr Ser Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn
 210 215 220
 Thr Thr Trp Glu Asp His Cys Gln Phe Ser Arg Pro Ser Pro Ile Gly
 225 230 235 240
 Tyr Leu Gly Leu Leu Ser Gln Arg Thr Arg Asp Ile Tyr Ile Ser Arg
 245 250 255
 Arg Leu Leu Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu Ser Asp Ser Glu Gly Lys
 260 265 270
 Asp Thr Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Arg Trp Met Leu Ile Glu Ala
 275 280 285
 Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val Ala Lys Cys Asn Glu Lys
 290 295 300
 His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg Leu Phe Asp Phe Asn Lys
 305 310 315 320
 Gln Ala Ile Gln Arg Leu Lys Ala Glu Ala Gln Met Ser Ile Gln Leu
 325 330 335
 Ile Asn Lys Ala Val Asn Ala Leu Ile Asn Asp Gln Leu Ile Met Lys
 340 345 350
 Asn His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys
 355 360 365
 Tyr Trp Tyr Leu Asn His Thr Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Pro Lys
 370 375 380

ES 2 758 713 T3

Cys Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Ser
385 390 395 400

Asp Asp Ile Glu Gln Gln Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Gln
405 410 415

Lys Glu Tyr Met Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Leu Gly Leu Val Asp
420 425 430

Leu Phe Val Phe Ser Thr Ser Phe Tyr Leu Ile Ser Ile Phe Leu His
435 440 445

Leu Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile Val Gly Lys Ser Cys Pro
450 455 460

Lys Pro His Arg Leu Asn His Met Gly Ile Cys Ser Cys Gly Leu Tyr
465 470 475 480

Lys Gln Pro Gly Val Pro Val Lys Trp Lys Arg
485 490

<210> 6

<211> 491

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VLAS de referencia (aminoácidos)

<400> 6

Met Gly Gln Ile Val Thr Phe Phe Gln Glu Val Pro His Val Ile Glu
1 5 10 15

Glu Val Met Asn Ile Val Leu Ile Ala Leu Ser Val Leu Ala Val Leu
20 25 30

Lys Gly Leu Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Leu Val Gly Leu Val Thr
35 40 45

Phe Leu Leu Leu Cys Gly Arg Ser Cys Thr Thr Ser Leu Tyr Lys Gly
50 55 60

Val Tyr Glu Leu Gln Thr Leu Glu Leu Asn Met Glu Thr Leu Asn Met
65 70 75 80

Thr Met Pro Leu Ser Cys Thr Lys Asn Asn Ser His His Tyr Ile Met
85 90 95

ES 2 758 713 T3

Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	Glu	Leu	Ser	Leu	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	100	105	110
Ile	Asn	His	Lys	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	His	Lys	Lys	Asn	Leu	115	120	125
Tyr	Asp	His	Ala	Leu	Met	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Phe	His	Leu	Ser	Ile	130	135	140
Pro	Asn	Phe	Asn	Gln	Tyr	Glu	Ala	Met	Ser	Cys	Asp	Phe	Asn	Gly	Gly	145	150	155
Lys	Ile	Ser	Val	Gln	Tyr	Asn	Leu	Ser	His	Ser	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ala	165	170	175
Ala	Asn	His	Cys	Gly	Thr	Val	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Gln	Thr	Phe	Met	180	185	190
Arg	Met	Ala	Trp	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	Ala	Leu	Asp	Ser	Gly	Arg	Gly	195	200	205
Asn	Trp	Asp	Cys	Ile	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	210	215	220
Thr	Thr	Trp	Glu	Asp	His	Cys	Gln	Phe	Ser	Arg	Pro	Ser	Pro	Ile	Gly	225	230	235
Tyr	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Gln	Arg	Thr	Arg	Asp	Ile	Tyr	Ile	Ser	Arg	245	250	255
Arg	Leu	Leu	Gly	Thr	Phe	Thr	Trp	Thr	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	Lys	260	265	270
Asp	Thr	Pro	Gly	Gly	Tyr	Cys	Leu	Thr	Arg	Trp	Met	Leu	Ile	Glu	Ala	275	280	285
Glu	Leu	Lys	Cys	Phe	Gly	Asn	Thr	Ala	Val	Ala	Lys	Cys	Asn	Glu	Lys	290	295	300
His	Asp	Glu	Glu	Phe	Cys	Asp	Met	Leu	Arg	Leu	Phe	Asp	Phe	Asn	Lys	305	310	315
Gln	Ala	Ile	Gln	Arg	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Gln	Met	Ser	Ile	Gln	Leu	325	330	335
Ile	Asn	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Ile	Asn	Asp	Gln	Leu	Ile	Met	Lys	340	345	350

ES 2 758 713 T3

Asn His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys
 355 360 365

Tyr Trp Tyr Leu Asn His Thr Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Pro Lys
 370 375 380

Cys Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Ser
 385 390 395 400

Asp Asp Ile Glu Gln Gln Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Gln
 405 410 415

Lys Glu Tyr Met Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Leu Gly Leu Val Asp
 420 425 430

Val Phe Val Phe Ser Thr Ser Phe Tyr Leu Ile Ser Ile Phe Leu His
 435 440 445

Leu Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile Val Gly Lys Ser Cys Pro
 450 455 460

Lys Pro His Arg Leu Asn His Met Gly Ile Cys Ser Cys Gly Leu Tyr
 465 470 475 480

Lys Gln Pro Gly Val Pro Val Lys Trp Lys Arg
 485 490

REIVINDICACIONES

1. Vacuna de plásmido de ADN que comprende una secuencia codificante de nucleótidos que codifica una o más proteínas inmunogénicas capaces de generar una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VLAS en un sujeto que lo necesita, en la que la secuencia codificante codifica un precursor de glucoproteína del VLAS, de codones optimizados para dicho sujeto y en el que la secuencia codificante comprende la SEC ID nº 1 o 2.
2. Vacuna de plásmido de ADN según la reivindicación 1, en la que dicha vacuna de plásmido de ADN consiste esencialmente en una de dichas secuencias codificantes.
3. Vacuna de plásmido de ADN según la reivindicación 1, en la que dicha vacuna de plásmido de ADN consiste esencialmente en por lo menos dos de dichas secuencias codificantes.
4. Vacuna de plásmido de ADN según la reivindicación 1, que comprende además un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en IL-12, IL-15, IL-28 o RANTES.
5. Vacuna de plásmido de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la utilización en un método de inducción de una respuesta inmunitaria protectora contra el VLAS en un sujeto.
6. Vacuna de plásmido de ADN para la utilización según la reivindicación 5, en la que la vacuna de ADN se administra mediante electroporación.
7. Vacuna de plásmido de ADN para la utilización según la reivindicación 6, en la que la etapa de electroporación comprende administrar un pulso energético de electroporación en el sitio de administración de la vacuna.
8. Vacuna de plásmido de ADN para la utilización según la reivindicación 7, en la que la etapa de administración y la etapa de electroporación se producen ambas en una capa intradérmica de dicho sujeto.

Figura 1

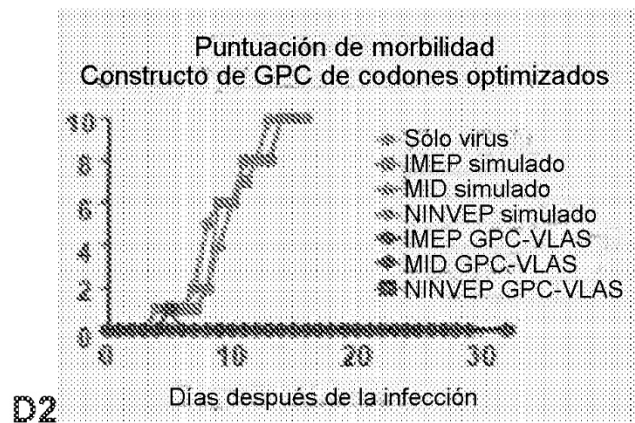
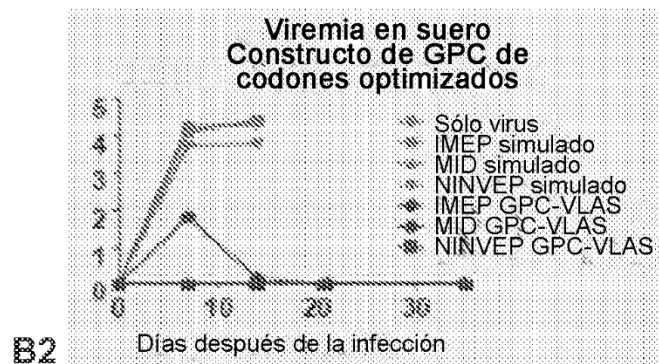
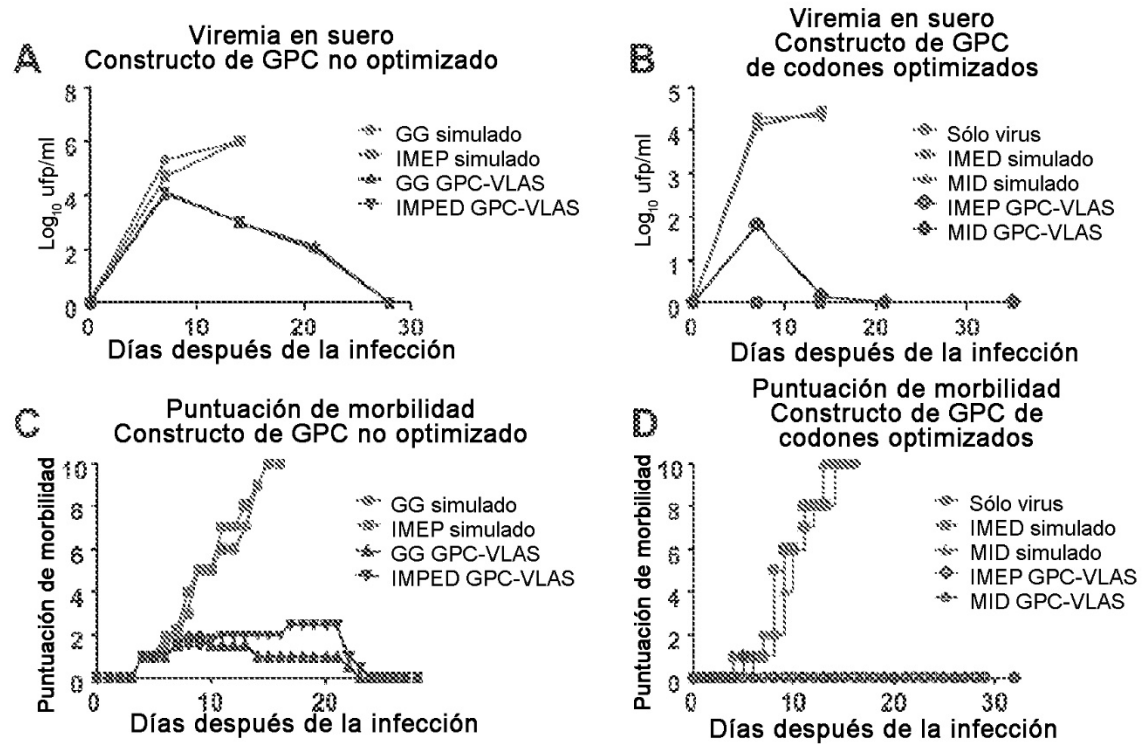


Figura 2

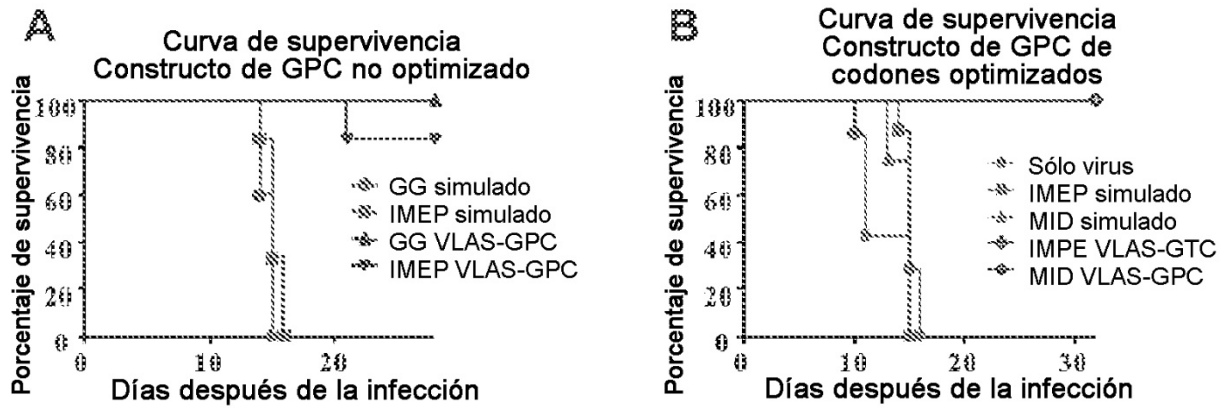


Figura 3

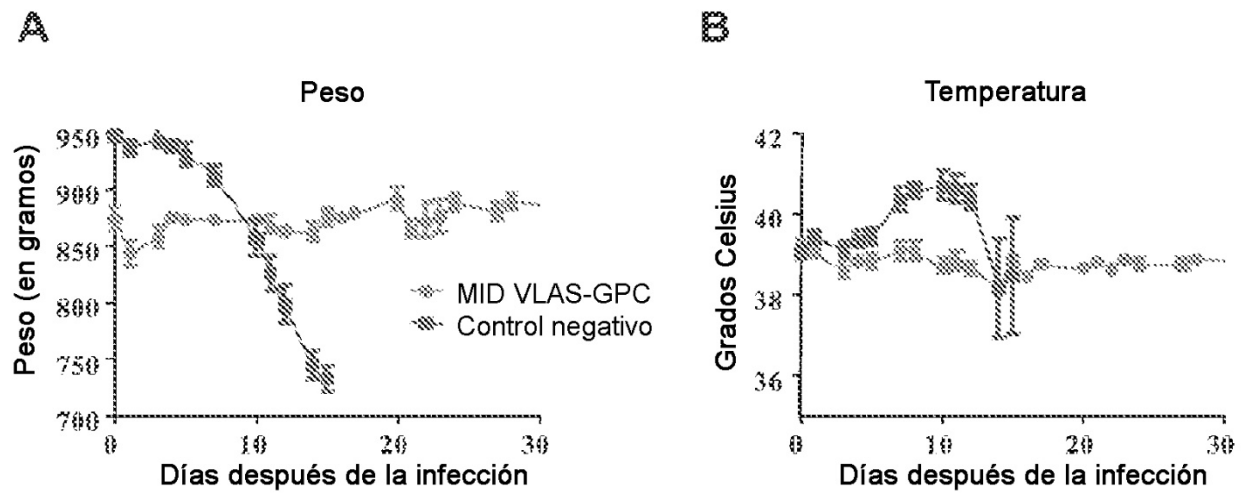


Figura 4

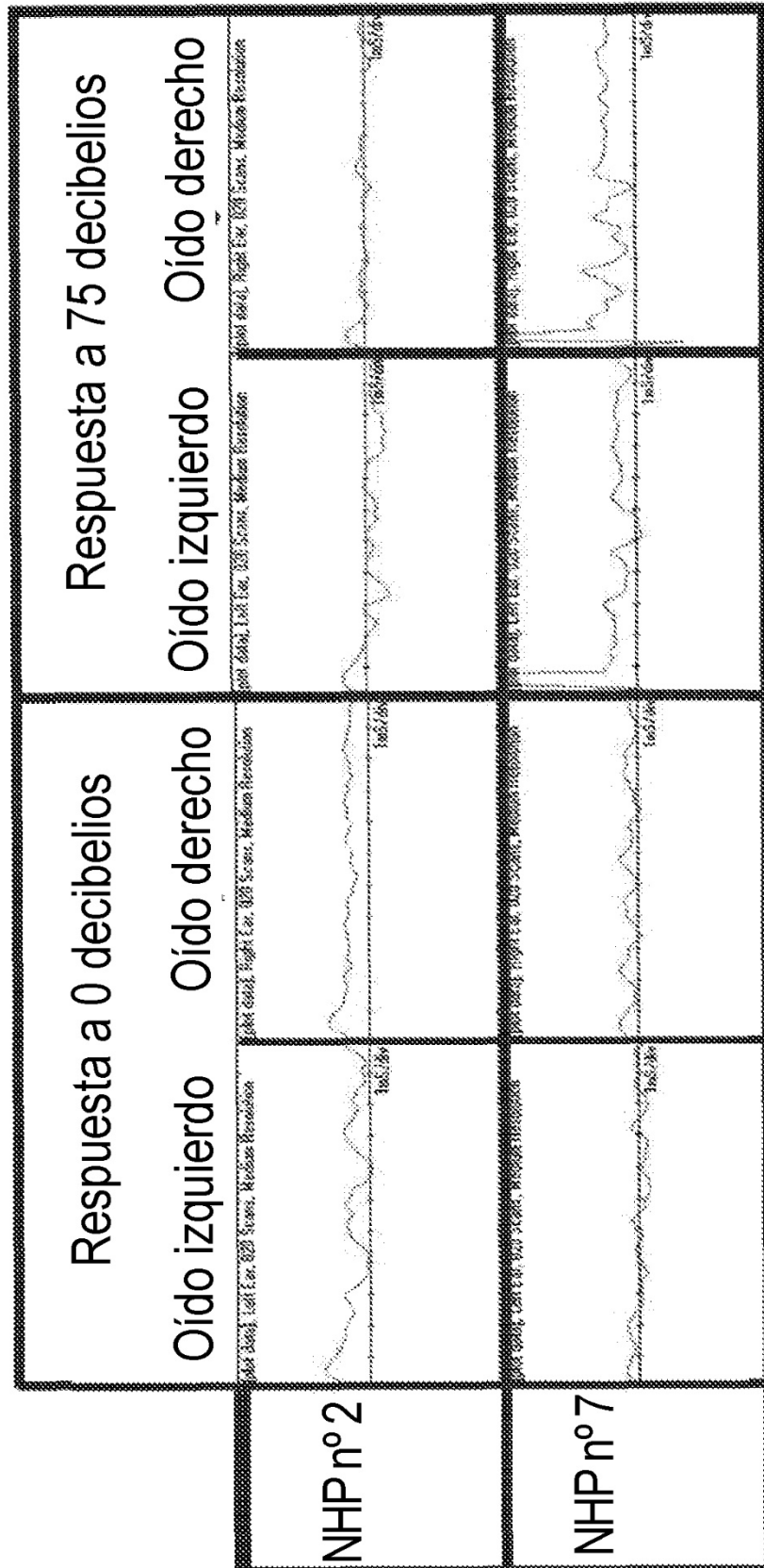


Figura 5

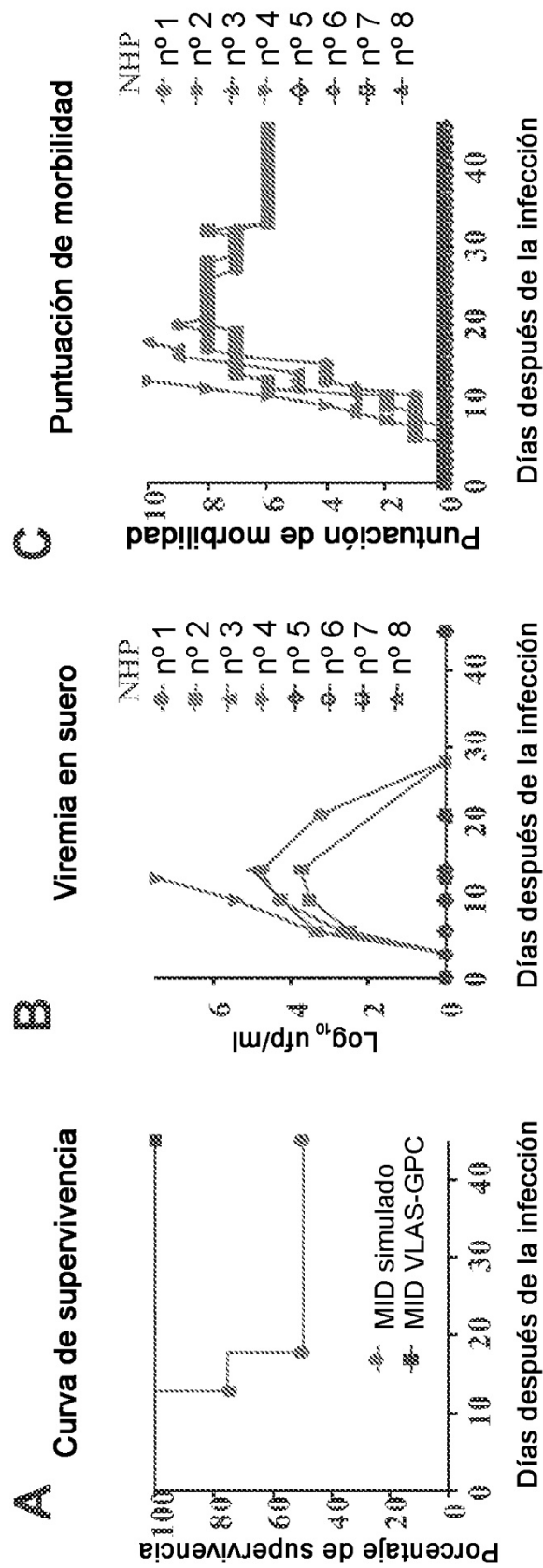


Figura 6A

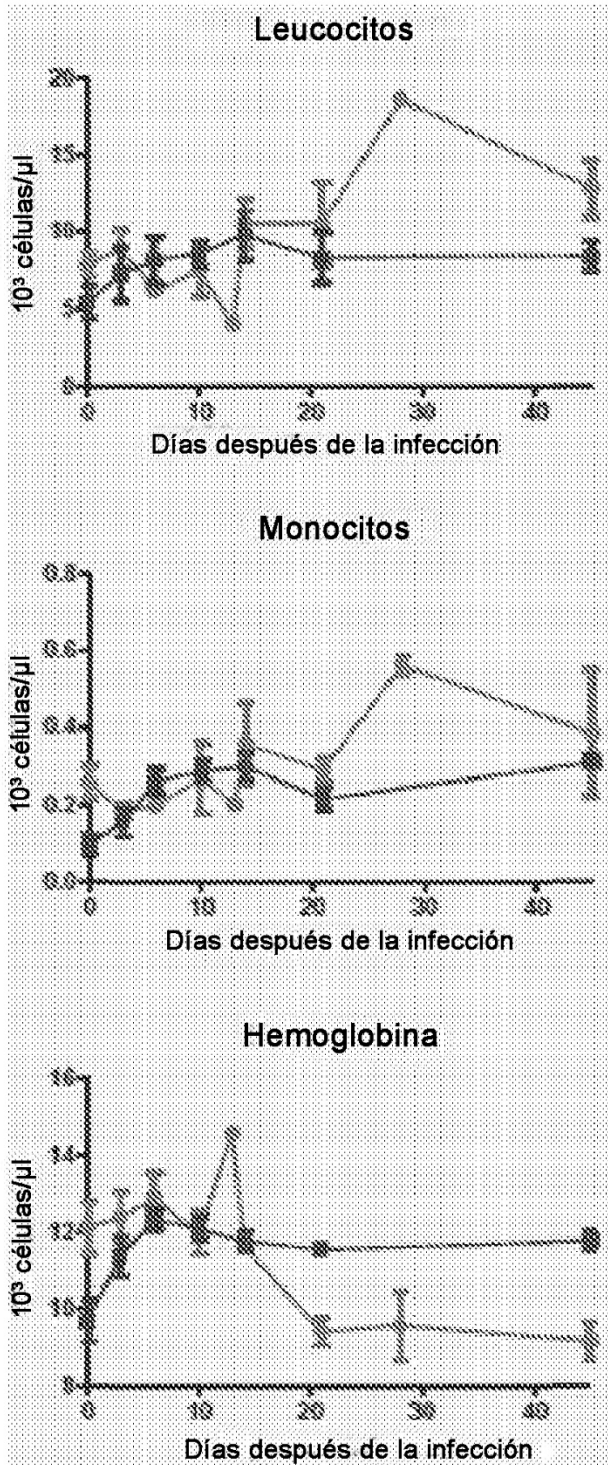
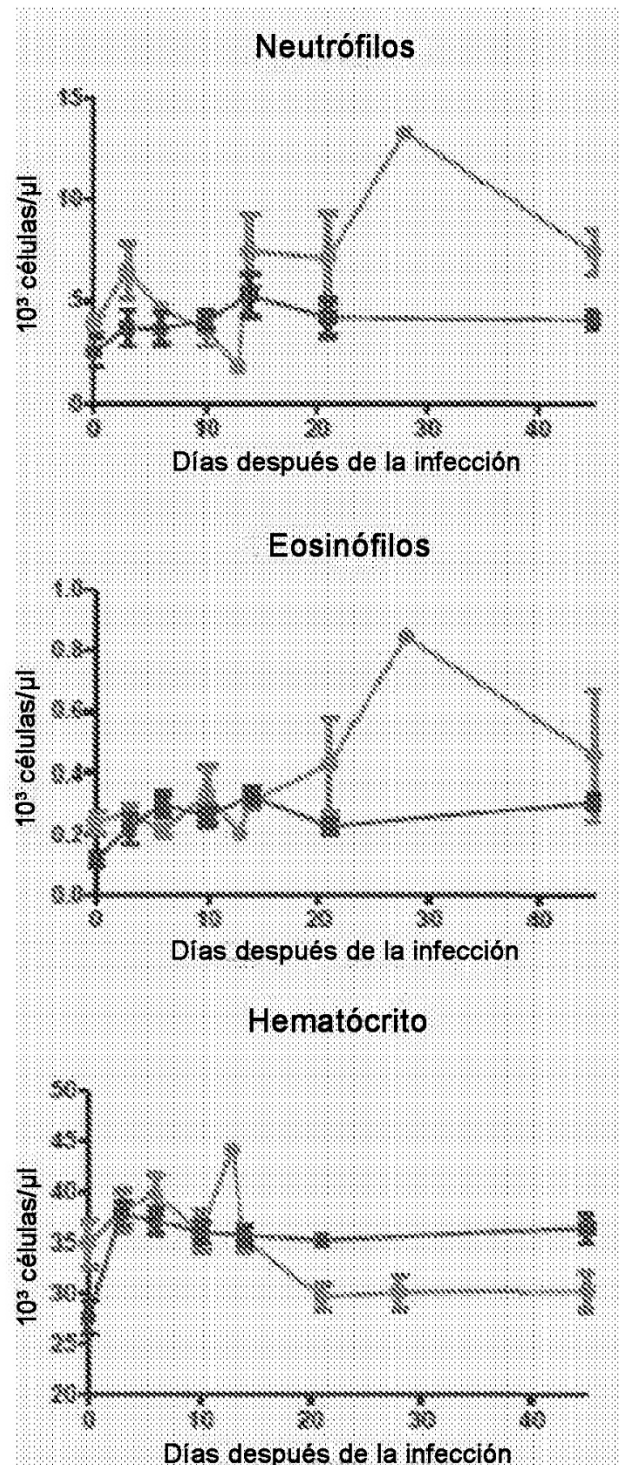


Figura 6B



 Simulado
 VLAS-GPC

Figura 6C

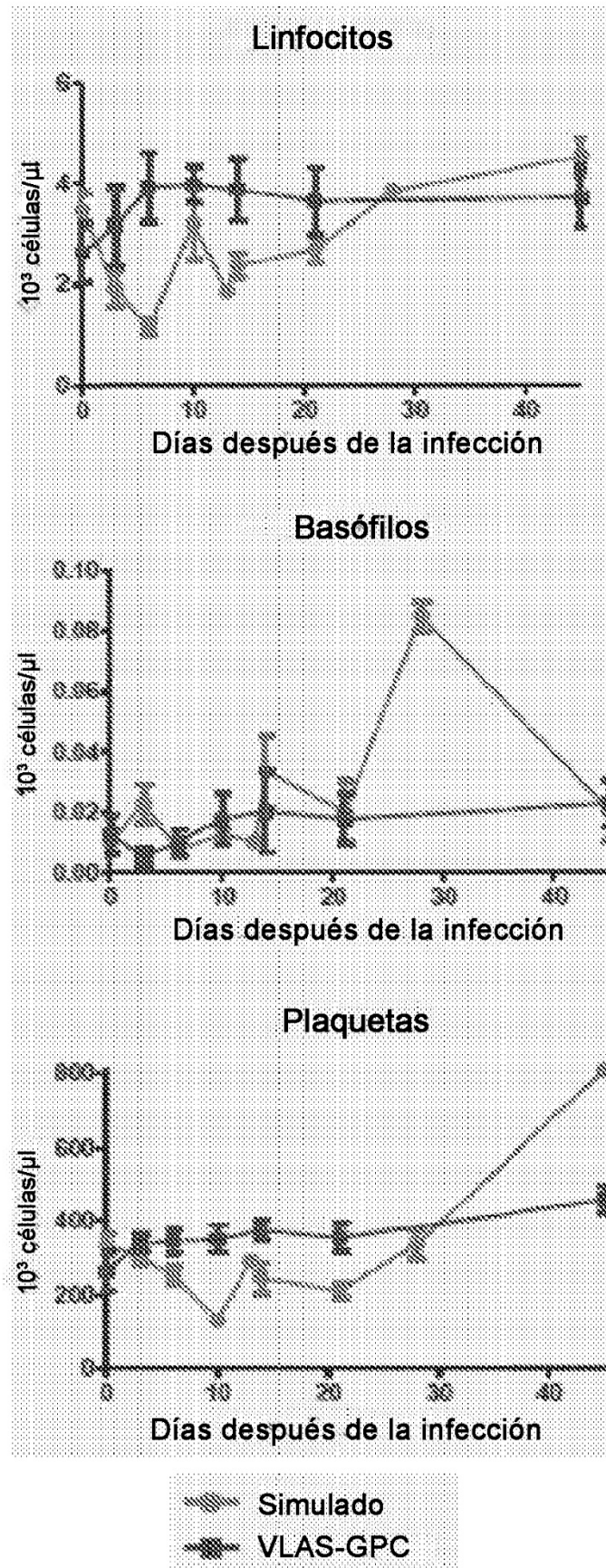
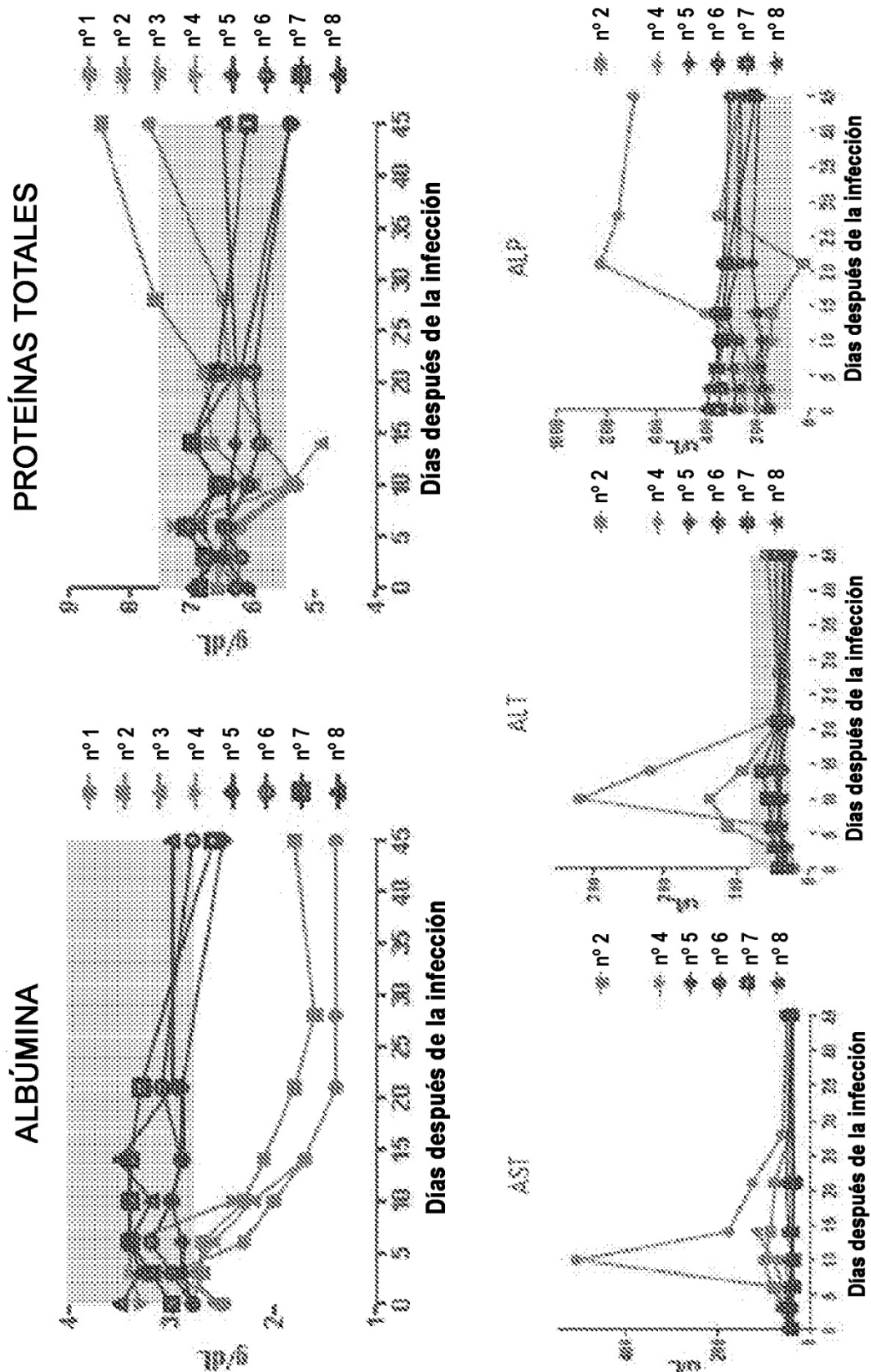


Figura 7



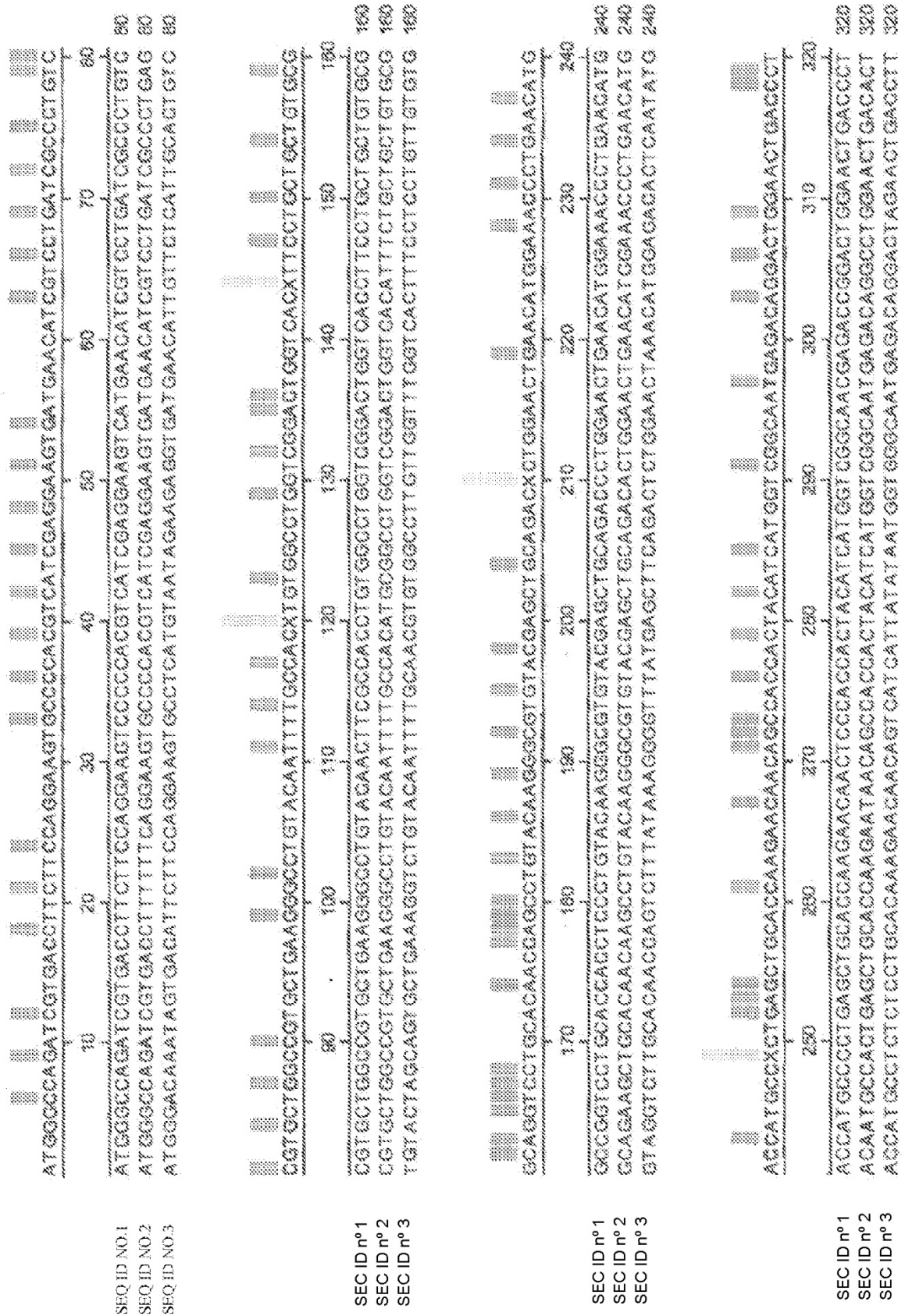


Figura 8

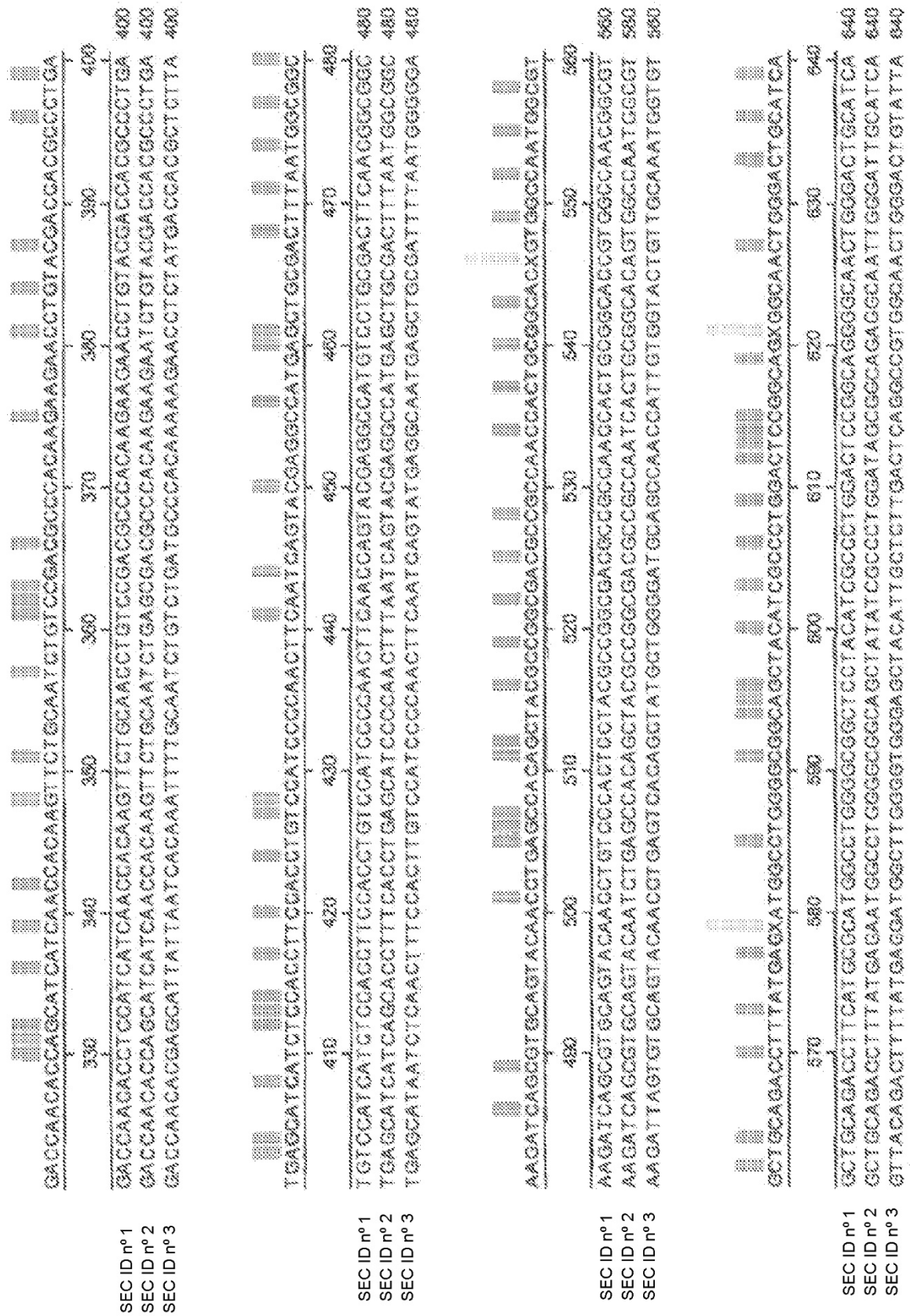


Figura 8 (continuación)

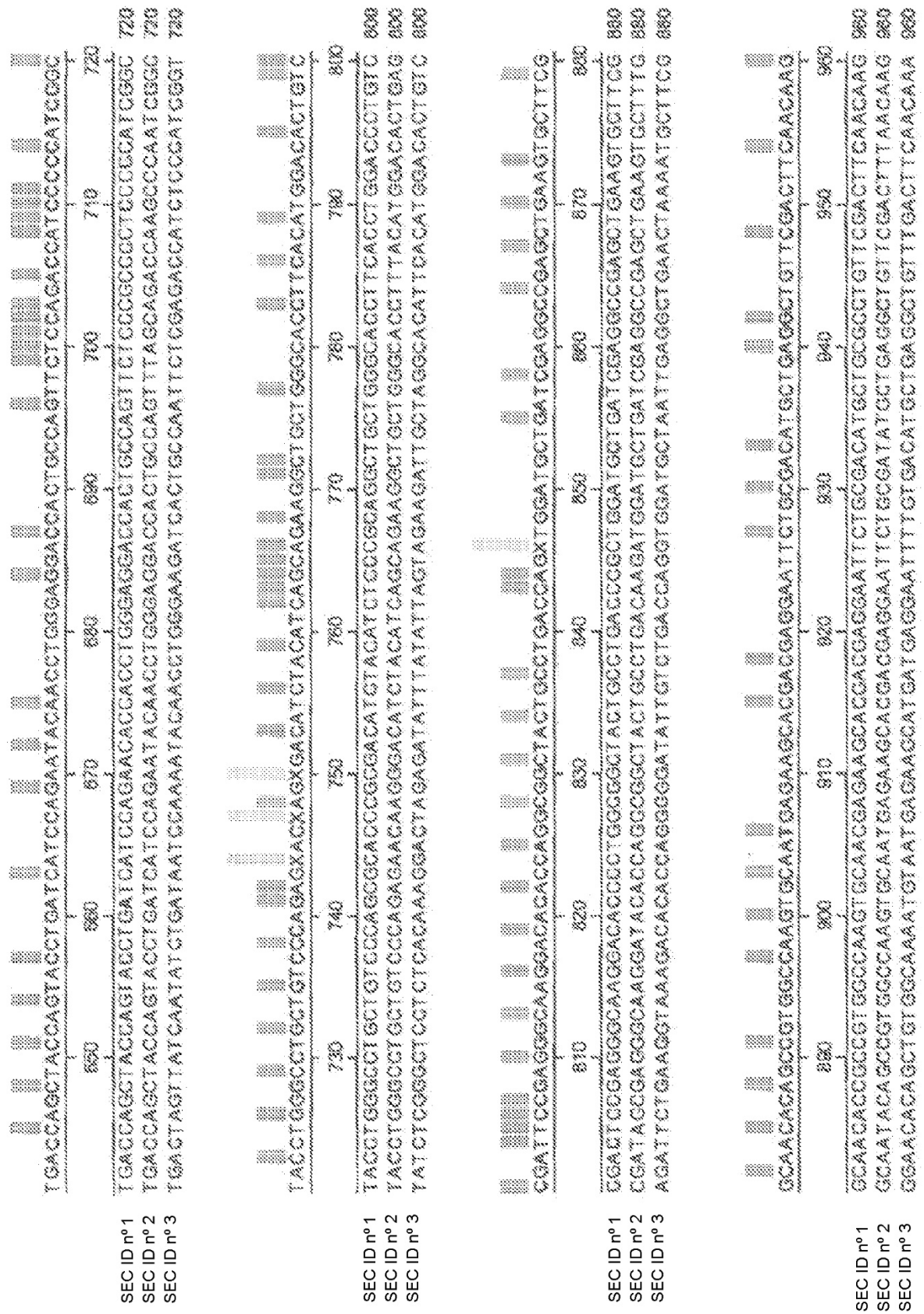


Figura 8 (continuación)



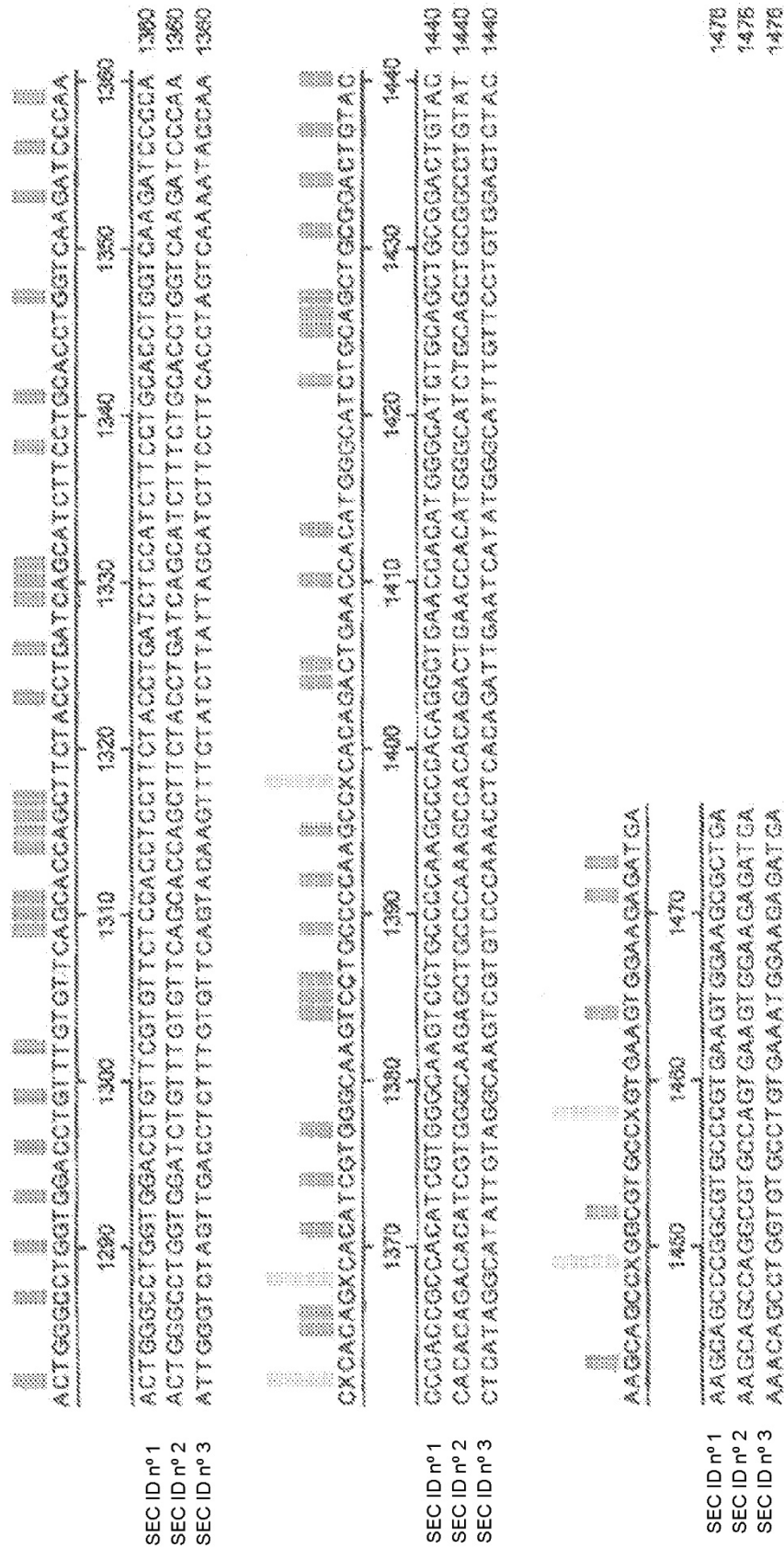


Figura 8 (continuación)