(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 256 323**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)
C12N 15/39 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/285 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2001 PCT/EP2001/13628**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2002 WO0242480**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2001 E 01991753 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.06.2016 EP 1335987**

(54) Título: **Variante del virus Vaccinia Ankara Modificado**

(30) Prioridad:

23.11.2000 DK 200001764

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
21.11.2016

(73) Titular/es:

BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)
Hejreskovvej 10 A
3490 Kvistgaard, DK

(72) Inventor/es:

CHAPLIN, PAUL;
HOWLEY, PAUL y
MEISINGER, CHRISTINE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 256 323 T5

DESCRIPCIÓN

Variante del virus Vaccinia Ankara Modificado

La presente invención proporciona las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. De este modo, se relaciona con un virus atenuado, que se deriva del virus Vaccinia Ankara Modificado y el cual está caracterizado por la pérdida de su capacidad para replicarse de manera reproductiva en las líneas celulares humanas siguientes: la línea celular de osteosarcoma del hueso humano 143B, la línea celular del queratinocito humano HaCat y la línea celular del adenocarcinoma cervical humano HeLa. Adicionalmente describe virus recombinantes derivados de este virus y el uso del virus o sus recombinantes como medicamento o vacuna. Adicionalmente, es proporcionado un método para inducir una respuesta inmune incluso en pacientes inmuno comprometidos, pacientes con inmunidad pre-existente al virus de la vacuna o pacientes que son sometidos a terapia antiviral.

Antecedente de la invención

El virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) está relacionado con el virus Vaccinia, un miembro del género Ortopoxvirus en la familia del Poxviridae. El MVA ha sido generado por 516 pasajes en serie en fibroblastos de embrión de pollo de la cepa Ankara del virus vaccinia (CVA) (para revisión ver Mayr, A., *y otros.* Infection 3, 6-14 [1975]). Como consecuencia de estos pasajes de larga duración el virus MVA resultante eliminó alrededor de 31 kilobases de su secuencia genómica y, por lo tanto, fue descrito como una célula altamente hospedera restringida a células de aves (Meyer, H. *y otros*, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 [1991]). Fue mostrado, en una variedad de modelos de animales que el MVA resultante fue significativamente no virulento (Mayr, A. & Danner, K. [1978] Dev. Biol. Stand. 41: 225-34). Adicionalmente esta cepa del MVA ha sido probada en pruebas clínicas como vacuna para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana (Mayr *y otros*, Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B 167, 375-390 [1987]. Stickl *y otros*, Dtsch. Med. Wschr. 99, 2386-2392 [1974]). Estos estudios involucraron más de 120,000 humanos, incluyendo pacientes de alto riesgo, y probaron que, en comparación con las vacunas basadas en Vaccinia, el MVA tenía una virulencia o capacidad de infectar disminuida mientras mantenía buena inmunogenicidad.

En las siguientes décadas el MVA ha sido diseñado para ser usado como vector viral para la expresión de genes recombinantes o como vacuna recombinante (Sutter, G. *y otros* [1994], Vaccine 12: 1032-40).

Con respecto a esto es más sorprendente que incluso aunque Mayr *y otros* demostraron durante la década de 1970 que el MVA está altamente atenuado y que no es virulento para los humanos y mamíferos, algunas observaciones reportadas recientemente (Blanchard *y otros*, 1998, J Gen Virol 79, 1159-1167; Carroll & Moss, 1997, Virology 238, 198-211; Altenberger, Patente US 5,185,146; Ambrosini *y otros*, 1999, J Neurosci Res 55(5), 569) han mostrado que el MVA no está completamente atenuado en las líneas celulares de humanos y mamíferos ya que la replicación residual pudiera ocurrir en estas células. Se asume que los resultados reportados en estas publicaciones han sido obtenidos con varias cepas del MVA, ya que los virus usados difieren esencialmente en sus propiedades, particularmente en su comportamiento en cuanto al crecimiento en varias líneas celulares.

El comportamiento en cuanto al crecimiento es reconocido como un indicador para la atenuación del virus. Generalmente, una cepa de virus se considera como atenuada si ha perdido su capacidad o solamente tiene capacidad reducida para replicarse de manera reproductiva en células hospederas. La observación antes mencionada, que el MVA no es completamente incompetente a la replicación en células humanas o de mamíferos, pone en duda la seguridad absoluta del MVA como una vacuna humana o un vector para vacunas recombinantes.

Particularmente, para una vacuna así como para una vacuna recombinante el balance entre la eficacia y la seguridad del virus vector de la vacuna es extremadamente importante.

Objeto de la invención

Así, es un objeto de la invención proporcionar nuevas cepas de virus que tengan una seguridad mejorada para el desarrollo de productos más seguros tales como vacunas o productos farmacéuticos. Por otra parte, un objeto adicional es proporcionar medios para mejorar el régimen de vacunación existente.

Descripción detallada de la invención

Para lograr los objetivos anteriores, se proporcionan nuevos virus vaccinia. Son la cepa del virus vaccinia Ankara modificado MVA-BN depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células (ECACC), Salisbury (GB) bajo el número V00083008 y sus derivados, donde dicha cepa de Ankara MVA-BN o sus derivados están caracterizados (i) en ser capaces de replicación reproductiva en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y en la línea celular de riñón de hámster bebé BHK pero no ser capaces de replicación reproductiva en las líneas celulares humanas siguientes: la línea celular de osteosarcoma del hueso humano 143B, la línea celular del queratinocito humano HaCat y la línea celular del adenocarcinoma cervical humano HeLa y (ii) por una falla para replicarse in vivo en ratones severamente inmuno comprometidos que son incapaces de producir células B y T maduras.

Las cepas de vaccinia conocidas que se replican de manera reproductiva en al menos algunas líneas celulares humanas, en particular en la línea celular del queratinocito humano HaCat (Boukamp y otros 1988, J Cell Biol

106(3): 761-71). La replicación en la línea celular HaCat es un pronóstico para la replicación in vivo, en particular para la replicación in vivo en humanos. Verdaderamente, es mostrado en la sección de los ejemplos que todas las cepas de vaccinia conocidas probadas que muestran una replicación productiva residual en HaCat también se replican in vivo. Así, la invención se relaciona con los virus vaccinia que no se replican de manera reproductiva en las líneas celulares humanas HaCat así como en las líneas celulares humanas 143B y HeLa. Más preferiblemente la invención se refiere a cepas del virus vaccinia que no son capaces de replicación reproductiva en ninguna de las siguientes líneas celulares humanas: la línea celular de adenocarcinoma cervical humano HeLa (ATCC No. CCL-2), la línea celular de riñón de embrión humano 293 (ECACC No. 85120602), la línea celular de osteosarcoma del hueso humano 143B (ECACC No. 91112502) y la línea celular HaCat.

El comportamiento en cuanto al crecimiento o la amplificación/replicación de un virus es normalmente expresado por la proporción del virus producido a partir de una célula infectada (Salida) con relación a la cantidad originalmente usada para infectar las células en el primer lugar (Entrada) ("proporción de amplificación"). Una proporción de "1" entre la Salida y la Entrada define un estado de amplificación donde la cantidad de virus producido a partir de las células infectadas es la misma que la cantidad inicialmente usada para infectar las células. Este estado indica el hecho, de que las células infectadas son tolerante a la infección por el virus y a la reproducción del virus.

Una proporción de amplificación menor que 1, es decir un decrecimiento de la amplificación por debajo del nivel de entrada es un indicador de carencia de la replicación reproductiva y, de esta manera, un indicador de la atenuación del virus. Por lo tanto, era de particular interés para los inventores identificar y finalmente aislar una cepa, que muestre una proporción de amplificación de menos que 1 en varias líneas celulares humanas, en particular en todas las líneas celulares humanas 143B, HeLa, 293 y HaCat.

Así, el término "no capaz de replicación reproductiva" significa que el virus de acuerdo a la invención muestra una proporción de amplificación menor que 1 en las líneas celulares humanas, tales como las líneas celulares 293 (ECACC No. 85120602), 143B (ECACC No. 91112502), HeLa (ATCC No. CCL-2) y HaCat (Boukamp *y otros* 1988, J Cell Biol 106(3): 761-71), bajo las condiciones indicadas en el ejemplo 1 de la presente descripción para algunas cepas de MVA específicas. Preferiblemente, la proporción de amplificación del virus de acuerdo a la invención es 0.8 o menos en cada una de las líneas celulares humanas anteriores HeLa, HaCat y 143B.

Es mostrado en detalle en el Ejemplo 1 y en la tabla 1 que los virus de acuerdo a la presente invención no se replican de manera reproductiva en ninguna de las líneas celulares 143B, HeLa y HaCat. La cepa particular de acuerdo a la presente invención que ha sido usada en los ejemplos ha sido depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células bajo el número V00083008. Esta cepa es referida como "MVA-BN" a lo largo de toda la descripción.

Las cepas de MVA conocidas muestran replicación residual en al menos una de las líneas celulares humanas probadas (figura 1, ejemplo 1). Todas las cepas de Vaccinia conocidas muestran al menos alguna replicación en la línea celular HaCat, mientras las cepas de MVA de acuerdo a la presente invención, en particular la MVA-BN, no se replica de manera reproductiva en las células HaCat. En más detalles la MVA-BN muestra una proporción de amplificación de 0.05 a 0.2 en la línea celular de riñón de embrión Humano 293 (ECACC No. 85120602). En la línea celular de osteosarcoma del hueso Humano 143B (ECACC No. 91112502) la proporción está en el rango de 0.0 a 0.6. Para la línea celular de adenocarcinoma cervical Humano HeLa (ATCC No. CCL-2) y la línea celular de queratinocito humano HaCat (Boukamp *y otros* 1988, J Cell Biol 106(3): 761-71) la proporción de amplificación está en el rango de 0.04 a 0.8 y de 0.02 a 0.8, respectivamente. La MVA-BN tiene una proporción de amplificación de 0.01 a 0.06 en células de riñón de mono verde Africano (CV1: ATCC No. CCL-70). Así, la MVA-BN que es una cepa prototipo de acuerdo a la presente invención no se replica de manera productiva en ninguna de las líneas celulares humanas probadas.

La proporción de amplificación de la MVA-BN está claramente por encima de 1 en los fibroblastos de embrión de pollo (CEF: cultivos primarios) o en la línea celular de riñón de hámster bebé BHK (ATCC No. CRL-1632, ECACC No. 85011433). Como se indicó anteriormente, una proporción de más de "1" indica replicación reproductiva, ya que la cantidad de virus producida a partir de las células infectadas está incrementada en comparación con la cantidad de virus, que fue usada para infectar las células. Por lo tanto, el virus puede ser fácilmente propagado y amplificado en los cultivos primarios de CEF con una proporción por encima de 500 o en células de BHK con una proporción por encima de 50.

En una realización particular de la presente invención la invención se refiere a los derivados del virus depositado bajo el ECACC V0083008. "Derivados" del virus depositados bajo el ECACC V00083008 se refieren a los virus que muestran esencialmente las mismas características de replicación que la cepa depositada pero mostrando diferencias en una o más partes de su genoma. Los virus que tienen las mismas "características de replicación" que el virus depositado son virus que se replican con proporciones de amplificación similares que la cepa depositada en las células de CEF y en la líneas celulares de BHK, HeLa, HaCat y 143B y que muestran una replicación similar en vivo como es determinado en el modelo de ratón transgénico AGR129 (ver a continuación).

La cepa del virus vaccinia de acuerdo a la presente invención, MVA-BN y sus derivados, están caracterizados por una falla para replicarse in vivo. En el contexto de la presente invención "falla para replicarse in vivo" se refiere a los

virus que no se replican en humanos y en el modelo de ratón explicado a continuación. La "falla para replicarse in vivo" puede ser preferiblemente determinada en ratones que no son capaces de producir células T y B maduras. Un ejemplo de tales ratones es el modelo de ratón transgénico AGR129 (obtenido de Mark Sutter, Instituto de Virología, Universidad de Zurich, Zurich, Suiza). Esta cepa de ratón tienen disrupciones marcadas del gen en los genes receptores IFN de tipo I (IFN-α/β) y tipo II (IFN-γ) y en *RAG.* Debido a estas disrupciones los ratones no tienen sistema IFN y no son capaces de producir células T y B maduras y como tal están severamente inmuno comprometidos y altamente susceptibles a un virus replicante. En vez de los ratones AGR129 cualquier otra cepa de ratón puede ser usada que sea incapaz de producir células T y B maduras y como tal esté severamente inmuno comprometido y altamente susceptible a un virus replicante. En particular los virus de acuerdo a la presente invención no matan a los ratones AGR129 dentro de un periodo de tiempo de al menos 45 días, más preferiblemente dentro de al menos 60 días, lo más preferido dentro de al menos 90 días después de la infección de los ratones con 10^7 pfu de virus administrado de manera intraperitoneal. Preferiblemente, los virus que muestran "falla para replicarse in vivo" están adicionalmente caracterizados en que ningún virus puede ser recuperado de los órganos o tejidos de los ratones AGR129 45 días, preferiblemente 60 días, lo más preferido 90 días después de la infección de los ratones con 10^7 pfu de virus administrado de manera intraperitoneal. Información detallada con respecto a los ensayos de la infección con los ratones AGR129 y los ensayos que son usados para determinar si el virus puede ser recuperado de los órganos y tejidos de los ratones infectados pueden ser encontrados en la sección de los ejemplos.

En una realización preferida la cepa del virus vaccinia de acuerdo a la presente invención, MVA-BN y sus derivados, está caracterizada por una inmunogenicidad más alta en comparación con la cepa MVA 575 conocida determinada en un modelo de ratón con desafío letal. Los detalles de este experimento están esbozados en el ejemplo 2, mostrado a continuación. Brevemente, en tal modelo ratones no vacunados murieron después de la infección con cepas de vaccinia competente para la replicación tal como la cepa Western Reserve L929 TK+ o IHD-J. La infección con virus vaccinia competentes para la replicación es referido como "desafío" en el contexto de la descripción del modelo de desafío letal. Cuatro días después del desafío los ratones están usualmente muertos y el título viral en los ovarios es determinado por ensayos de placa estándar usando células VERO (para más detalles ver la sección de los ejemplos). El título viral es determinado para ratones no vacunados y para ratones vacunados con virus vaccina de acuerdo a la presente invención. Más específicamente los virus de acuerdo a la presente invención están caracterizados en que en esta prueba después de la vacunación con 10^2 $TCID_{50}$/ml del virus de acuerdo a la presente invención los títulos de virus en los ovarios están reducidos en al menos 70%, preferiblemente en al menos 80%, más preferiblemente en al menos 90% en comparación con los ratones no vacunados.

En una realización preferida los virus vaccinia de acuerdo a la presente invención, MVA-BN y sus derivados, son útiles para la inmunización con administración primaria/reactivación de la vacuna. Han existido numerosos reportes sugiriendo que los regímenes primaria/reactivación usando MVA como un ventor de entrega inducen respuestas inmunes pobres y son inferiores a los regímenes ADN-primaria MVA-reactivación (Schneider *y otros*, 1998, Nat. Med. 4; 397-402). En todos estos estudios las cepas de MVA que han sido usadas son diferentes de los virus vaccinia de acuerdo a la presente invención. Para explicar la pobre respuesta inmune cuando el MVA fue usado para administración primaria y reactivación se ha hecho la hipótesis de que los anticuerpos generados para el MVA durante la administración primaria neutralizan el MVA dado en la segunda inmunización, previniendo una reactivación efectiva de la respuesta inmune. Por el contrario, los regímenes ADN-primaria/MVA-reactivación están reportados como superiores al generar repuestas de alta afinidad, ya que este régimen combina la capacidad del ADN para de manera efectiva iniciar la respuesta inmune con las propiedades del MVA para reactivar esta respuesta en ausencia de una inmunidad pre-existente al MVA. Claramente, si una inmunidad al MVA y/o al vaccinia pre-existente evita la reactivación de la respuesta inmune entonces el uso del MVA como una vacuna o agente terapéutico tendría eficacia limitada, particularmente en los individuos que han sido vacunados contra la viruela. Sin embargo, de acuerdo a una realización adicional el virus vaccinia de acuerdo a la presente invención, MVA-BN y sus derivados así como los virus recombinantes correspondientes que contienen secuencias heterólogas, pueden ser usados para primero iniciar y luego reactivar las respuestas inmunes eficientemente en animales naturales así como en animales con una inmunidad pre-existente a los poxvirus. Así el virus vaccinia de acuerdo a la presente invención induce al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en regímenes de inoculación primaria del virus vaccinia/ reactivación del virus vaccinia en comparación con los regímenes de inoculación primaria del ADN/ reactivación del virus vaccinia.

Un virus vaccinia se considera induce al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de inoculación primaria del virus vaccinia/ reactivación del virus vaccinia en comparación con los regímenes de inoculación primaria del ADN/ reactivación del virus vaccinia si la respuesta CTL medida en uno de los siguientes dos ensayos („ensayo 1" y „ensayo 2"), preferiblemente en ambos ensayos, es al menos sustancialmente la misma en los regímenes de inoculación primaria del virus vaccinia/ reactivación del virus vaccinia en comparación con los regímenes de inoculación primaria del ADN/ reactivación del virus vaccinia. Más preferiblemente la respuesta CTL después de la administración de inoculación primaria de virus vaccinia/ reactivación del virus vaccinia es mayor en al menos uno de los ensayos, cuando se compara con los regímenes de inoculación primaria del ADN/reactivación del virus vaccinia. Lo más preferido es que la respuesta CTL sea mayor en los siguientes ambos ensayos.

<u>Ensayo 1:</u> Para las administraciones de inoculación primaria del virus vaccinia/reactivación del virus vaccinia ratones BALB/c (H-2d) de 6-8 semanas son inmunizados con una inoculación primaria por administración intravenosa con

10^7 $TCID_{50}$ del virus vaccinia de acuerdo a la presente invención que expresa el polítopo murino descrito en Thomson y otros, 1988, J. Immunol. 160, 1717 e inmunizados con reactivación con la misma cantidad del mismo virus, administrada de la misma forma tres semanas más tarde. En este punto es necesario construir un virus vaccinia recombinante que exprese dicho polítopo. Los métodos para construir tales virus recombinantes son conocidos por la persona versada en el arte y son descritos en más detalle a continuación. En los regímenes de inoculación primaria del ADN /reactivación del virus vaccinia la vacunación primaria es hecha mediante inyección intramuscular en los ratones con 50 µg de ADN que expresa el mismo antígeno que el virus vaccinia; la administración de la reactivación con el virus vaccinia es hecha exactamente de la misma forma que para la administración de la inoculación primaria del virus vaccinia/reactivación del virus vaccinia. El plásmido de ADN que expresa el polítopo es también descrito en la publicación que se hizo anteriormente referencia de Thomson y otros. En ambos regímenes el desarrollo de una respuesta CTL contra los epítopos SYIPSAEKI, RPQASGVYM y/o YPHFMPTNL es determinada dos semanas después de la administración de la reactivación. La determinación de la respuesta CTL es preferiblemente hecha usando el análisis ELISPOT descrito por Schneider y otros, 1998, Nat. Med. 4, 397-402 y como es esbozado en la sección de los ejemplos a continuación para un virus específico de acuerdo a la presente invención. El virus de acuerdo a la presente invención está caracterizado en este experimento en que la respuesta inmune CTL contra los epítopos mencionados anteriormente la cual es inducida por la administración de la inoculación primaria del virus vaccinia/reactivación de virus vaccinia es sustancialmente la misma, preferiblemente al menos la misma que es inducida por la administración de la inoculación primaria del ADN /reactivación del virus vaccinia evaluada por el número de células que producen INF-γ/10^6 células del vaso (ver también la sección experimental).

Ensayo 2: Este ensayo básicamente corresponde al ensayo 1. Sin embargo, en vez de usar 10^7 $TCID_{50}$ del virus vaccinia administrado por vía i.v. como en el ensayo 1, en este ensayo 10^8 $TCID_{50}$ del virus vaccinia de acuerdo a la presente invención son administrados por vía subcutánea para la inmunización primaria y la inmunización de reactivación. El virus de acuerdo a la presente invención está caracterizado en este experimento en que la respuesta inmune CTL contra los epítopos mencionados anteriormente la cual es inducida por la administración de inoculación primaria del virus vaccinia/reactivación del virus vaccinia es sustancialmente la misma, preferiblemente al menos la misma que es inducida por la administración de la inoculación primaria del ADN/reactivación del virus vaccinia evaluada por el número de células que producen INF-γ/10^6 células del vaso (ver también la sección experimental).

La fortaleza de una respuesta CTL medida en uno de los ensayos mostrados anteriormente corresponde al nivel de protección.

Así, los virus de acuerdo a la presente invención son particularmente apropiados para los propósitos de vacunación.

En resumen el virus vaccinia de acuerdo a la divulgación está caracterizado por tener al menos una de las siguientes propiedades:

(i) capacidad de replicación reproductiva en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y en la línea celular de BHK, pero no capacidad de replicación reproductiva en la línea celular humana HaCat,

(ii) falla para replicarse in vivo en ratones severamente inmuno comprometidos,

(iii) inducción de una inmunogenicidad más alta en comparación con la de la cepa MVA 575 conocida (ECACC V00120707) en un modelo de desafío letal y/o

(iv) inducción de al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de inoculación primaria del virus vaccinia/reactivación del virus vaccinia cuando se compara con los regímenes de inoculación primaria del ADN/reactivación del virus vaccinia.

Preferiblemente el virus vaccinia de acuerdo a la presente divulgación tiene al menos dos de las propiedades anteriores, más preferiblemente al menos tres de las propiedades anteriores. Los más preferidos son los virus vaccinia que tienen todas las propiedades anteriores.

En una realización adicional la invención se refiere a un kit de vacunación que comprende un virus de acuerdo a la presente invención para la primera vacunación („primaria") en un primer frasco/contenedor y para una segunda vacunación („reactivación") en un segundo frasco/contenedor. El virus puede ser un virus vaccinia no recombinante, es decir un virus vaccinia de la presente invención que no contenga secuencias de nucleotidos heterólogas. Un virus vaccinia de este tipo es el MVA-BN y sus derivados de la presente invención. Alternativamente el virus puede ser un virus vaccinia recombinante que contiene secuencias nucleotídicas adicionales que son heterólogas al virus vaccinia. Como es esbozado en otras secciones de la descripción las secuencias heterólogas pueden codificar para epítopos que inducen una respuesta por el sistema inmune. Así, es posible usar el virus vaccinia recombinante para vacunar contra las proteínas o agentes que comprenden dicho epítopo. Los virus pueden ser formulados como es mostrado a continuación en más detalle. La cantidad de virus que puede ser usada para cada vacunación ha sido definida anteriormente.

Es conocido para una persona versada en el arte, cómo se puede obtener virus Vaccinia que tengan al menos las siguientes propiedades:

- capacidad de replicación reproductiva en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y en la línea celular de riñón de hámster bebé BHK, pero no capacidad de replicación reproductiva en la línea celular de queratinocito humano HaCat,

- falla para replicarse in vivo,

- inducción de una inmunogenicidad más alta en comparación con la de la cepa MVA 575 conocida en un modelo de desafío letal y/o

- inducción de al menos sustancialmente del mismo nivel de inmunidad en los regímenes de inoculación primaria del virus vaccinia/reactivación del virus vaccinia cuando se compara con los regímenes de inoculación primaria del ADN/reactivación del virus vaccinia.

Un proceso para obtener tal virus puede comprender los siguientes pasos:

(i) introducir una cepa del virus vaccinia conocida, preferiblemente la MVA 574 o MVA 575 (ECACC V00120707) en células no humanas en las cuales el virus es capaz de replicarse de manera reproductiva, donde la cantidad de células no humanas son preferiblemente seleccionadas de células de CEF y la línea celular de BHK,

(ii) aislar/enriquecer partículas del virus de estas células y

(iii) analizar si el virus obtenido tiene al menos una de las propiedades biológicas deseadas como se definió anteriormente,

donde los pasos anteriores pueden opcionalmente ser repetidos hasta que un virus con las características de replicación deseadas sea obtenido. La divulgación adicionalmente se relaciona con los virus obtenidos por este método. Los métodos de cómo las propiedades biológicas deseadas pueden ser determinadas son explicados en otras partes de esta descripción.

Aplicando este método los inventores identificaron y aislaron en varias rondas de purificación de clones una cepa de acuerdo a la presente invención a partir del pasaje 575 aislado del MVA (MVA 575). Esta nueva cepa corresponde a la cepa con un número de acceso ECACC V0083008, mencionado anteriormente.

El comportamiento en cuanto al crecimiento de los virus vaccinia de acuerdo a la presente invención, en particular el comportamiento en cuanto al crecimiento del MVA-BN, indica que las cepas de acuerdo a la presente invención son mucho más superiores que cualquier otra aislada del MVA caracterizado hasta ahora con respecto a la atenuación en líneas celulares humanas y fallo de replicación in vivo. Las cepas de acuerdo a la presente invención son por lo tanto candidatas ideales para el desarrollo de productos más seguros tal como vacunas o productos farmacéuticos como será descrito a continuación.

En una realización el virus de acuerdo a la presente invención, MVA-BN y sus derivados, es usado como una vacuna contra las enfermedades del poxvirus humano, tal como la viruela. En una realización adicional el virus de acuerdo a la presente invención puede ser recombinante, es decir puede expresar genes heterólogos como, por ejemplo, antígenos o epítopos heterólogos al virus y puede así ser útil como una vacuna para inducir una respuesta inmune contra los antígenos o epítopos heterólogos.

El término “respuesta inmune” significa la reacción del sistema inmune, cuando una sustancia o microorganismo extraño entra en el organismo. Por definición, la respuesta inmune está dividida en una reacción específica y una no específica aunque ambas están estrechamente enlazadas de manera cruzada. La respuesta inmune no específica es la defensa inmediata contra una amplia variedad de sustancias extrañas y agentes infecciosos. La respuesta inmune específica es la defensa que surge después de una fase de retardo, cuando el organismo es desafiado con una sustancia por primera vez. La respuesta inmune específica es altamente eficiente y es responsable del hecho de que un individuo que se recupera de una infección específica es protegido contra esta infección específica. Así, una segunda infección con el mismo agente infeccioso o uno muy similar no causa ningún síntoma o causa síntomas mucho más benignos, debido a que ya hay una “inmunidad pre-existente” a este agente. Tal inmunidad y la memoria inmunológica, respectivamente, persisten por un largo tiempo, en algunos casos por toda la vida. Correspondientemente, la inducción de una memoria inmunológica puede ser usada para la vacunación.

El “sistema inmune” significa un órgano complejo involucrado en la defensa del organismo contra sustancias y microorganismos extraños. El sistema inmune comprende una parte celular que comprende varios tipos de células, tal como, por ejemplo, linfocitos y otras células derivadas de las células blancas de la sangre, y una parte humoral que comprende pequeños péptidos y factores complementarios.

“Vacunación” significa que el organismo es desafiado con un agente infeccioso, por ejemplo, en una forma atenuada o inactivada de dicho agente infeccioso, para inducir una inmunidad específica. El término vacunación también cubre el desafío de un organismo con el virus vaccinia recombinante de acuerdo a la presente invención, MVA-BN recombinante y sus derivados, que expresa antígenos o epítopos que son heterólogos al virus. Ejemplos de tales epítopos son dados en otras partes de la descripción y cubren, por ejemplo, los epítopos de proteínas derivadas de

otros virus tal como el virus del Dengue, el virus de la Hepatitis C, el HIV, o los epítopos derivados de proteínas que están asociadas con el desarrollo de tumores y del cáncer. Después de la administración del virus vaccinia recombinante al cuerpo los epítopos son expresados y son presentados al sistema inmune y una respuesta inmune específica contra estos epítopos puede ser inducida. El organismo, de esta manera, es inmunizado contra el agente/proteína que contiene el epítopo que es codificado por el virus vaccinia recombinante.

"Inmunidad" significa la protección parcial o completa de un organismo contra enfermedades causadas por un agente infeccioso debido a la eliminación exitosa de una infección precedente con dicho agente infeccioso o una parte característica del mismo. La inmunidad esta basada en la existencia, inducción y activación de las células especializadas del sistema inmune.

Como se señaló anteriormente en una realización de la invención, el virus recombinante de acuerdo a la presente invención, MVA-BN recombinante y sus derivados, contienen al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga. El término "heteróloga" es usado aquí en lo adelante para cualquier combinación de secuencias de ácidos nucleicos que no es normalmente encontrada asociada de manera estrecha con el virus en la naturaleza, tal virus es también llamado "virus recombinante".

De acuerdo a una realización adicional de la presente invención las secuencias heterólogas son preferiblemente epítopos antigénicos, que son seleccionados de cualquier fuente no vaccinia. Lo más preferido, es que dicho virus recombinante exprese uno o más epítopos antigénicos a partir del Plasmodium falciparum, la Micobacteria, el virus de la Influenza, a partir de virus seleccionados de la familia de los Flavivirus, los Paramixovirus, los virus de la Hepatitis, los virus de la inmunodeficiencia Humana o a partir de virus que causan fiebre hemorrágica tal como los Hantavirus o Filovirus, es decir, el virus del Ebola o Marburg.

De acuerdo a aún una realización adicional, pero también en adición a la selección de epítopos antigénicos antes mencionada, las secuencias heterólogas pueden ser seleccionadas de otra fuente poxviral o vaccinia. Estas secuencias virales pueden ser usadas para modificar el espectro del hospedero o la inmunogenicidad del virus.

En una realización adicional el virus de acuerdo a la presente invención puede codificar para un ácido nucleico/gen heterólogo que expresa un compuesto terapéutico. Un "compuesto terapéutico" codificado por el ácido nucleico heterólogo en el virus puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico terapéutico tal como un ácido nucleico anti sentido o un péptido o proteína con actividad biológica deseada.

De acuerdo con una realización adicional preferida la expresión de la secuencia del ácido nucleico heterólogo está preferiblemente, pero no exclusivamente, bajo el control transcripcional de un promotor de poxvirus, más preferiblemente de un promotor del virus vaccinia.

De acuerdo aún a una realización adicional la inserción de la secuencia de ácido nucleico heteróloga es preferiblemente en una región no esencial del genoma del virus. En otra realización preferida de la invención, la secuencia de ácido nucleico heteróloga es insertada en un sitio de eliminación natural del genoma del MVA (descrito en PCT/EP96/02926). Los métodos de cómo insertar las secuencias heterólogas en el genoma poxviral son conocidos por una persona versada en el arte.

De acuerdo a otra realización adicional preferida la divulgación incluye también el genoma del virus y sus recombinantes. Tales secuencias virales pueden ser usadas para identificar o aislar el virus o sus recombinantes, por ejemplo, usando PCR, tecnologías de hibridación o ensayos ELISA establecidos. Además, tales secuencias virales pueden ser expresadas a partir de un vector de expresión para producir el péptido o la proteína codificada la cual puede luego suplementar los mutantes de eliminación de un virus que carece de secuencia viral contenida en el vector de expresión.

El virus recombinante de acuerdo a la presente invención puede ser usado para la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula diana, siendo dicha secuencia homóloga o heteróloga a la célula diana. La introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula diana puede ser usada para producir *in vitro* polipéptidos o péptidos heterólogos y/o virus completos codificados por dicha secuencia. Este método comprende la infección de la célula hospedera con el MVA recombinante, el cultivo de la célula hospedera infectada bajo condiciones apropiadas, y el aislamiento y/o enriquecimiento del péptido, la proteína y/o el virus producido por dicha célula hospedera.

Además, el método para la introducción de una secuencia homóloga o de una heteróloga a las células pueden ser aplicadas para la terapia *in vitro* y preferiblemente *in vivo.* Para la terapia *in vitro*, las células aisladas que han sido previamente (*ex vivo*) infectadas con el virus son administradas al cuerpo de un animal vivo para inducir una respuesta inmune. Para la terapia *in vivo*, el virus o sus recombinantes son directamente administrados al cuerpo del animal vivo para inducir una respuesta inmune. En este caso, las células que rodean el sitio de inoculación son directamente infectadas *in vivo* por el virus o sus recombinantes de acuerdo a la invención.

Ya que el crecimiento del virus de acuerdo a la invención está altamente restringido en las células humanas y del mono y, de esta manera, altamente atenuado, este es ideal para tratar un amplio rango de mamíferos incluyendo los humanos. Por lo tanto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica y una vacuna, por

ejemplo, para inducir una respuesta inmune en un cuerpo animal vivo, incluyendo un humano. El virus de la invención es además seguro en otros protocolos de terapia génica.

La composición farmacéutica puede generalmente incluir uno o más estabilizadores, diluentes, adyuvantes, preservativos, antibióticos, aditivos y/o portadores aprobados y/o farmacéuticamente aceptables. Tales sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes emulsionantes o humectantes, sustancias buffer de pH, o similares. Portadores apropiados son típicamente moléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como las proteínas, los polisacaridos, los ácidos polilácticos, los ácidos poliglicólicos, los ácidos amino poliméricos, los copolímeros de amino ácidos, los agregados de lípidos, o similares.

Para la preparación de vacunas, el virus o sus recombinantes de acuerdo a la invención es convertido en una forma fisiológicamente aceptable. Esto puede ser hecho basado en la experiencia en la preparación de vacunas del poxvirus usadas para la vacunación contra la viruela (como es descrito por Stickl, H. *y otros* [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392). Por ejemplo, el virus purificado es almacenado a –80ºC con un título de $5x10^8$ $TCID_{50}$/ml formulada en alrededor de 10mM Tris, 140 mM NaCl pH 7.4. Para la preparación de las dosis de la vacuna, por ejemplo, 10^2-10^8 partículas del virus son liofilizadas en 100 ml de fosfato buffer salino (PBS) en presencia de 2% de peptona y 1% de albúmina humana en un ámpula, preferiblemente un ámpula de vidrio. Alternativamente, las dosis de vacuna pueden ser producidas por congelación-secado gradual del virus en una formulación. Esta formulación puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrana, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros aditivos tal como antioxidantes o gas inerte, estabilizadores o proteínas recombinantes (por ejemplo albúmina de suero humano) apropiada para administración *in vivo*. El ámpula de vidrio es entonces sellada y puede ser almacenada entre 4ºC y temperatura ambiente por varios meses. Sin embargo, mientras no exista la necesidad el ámpula es almacenada preferiblemente a temperaturas por debajo de -20ºC.

Para la vacunación o la terapia el liofilizado puede ser disuelto en 0.1 a 0.5 ml de una solución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica o buffer Tris, y administrado de manera sistémica o localmente, es decir de manera parenteral, intramuscular o cualquier otra vía de administración conocida para un experto en la práctica. El modo de administración, la dosis y el número de administraciones puede ser optimizado por aquellos expertos en el arte de una manera conocida.

Adicionalmente, de acuerdo a una realización adicional el virus de acuerdo a la presente invención es particularmente útil para inducir respuestas inmunes en animales inmuno comprometidos, por ejemplo, monos (CD4 $<$ 400/µl de sangre) infectados con el SIV, o en humanos inmuno comprometidos. El término “inmuno comprometido” describe el estado del sistema inmune de un individuo, el cual muestra solamente respuestas inmunes incompletas o tiene una eficiencia reducida en la defensa contra los agentes infecciosos. Aún más interesante y de acuerdo a aún una realización adicional el virus de acuerdo a la presente invención puede reactivar respuestas inmunes en humanos o animales inmuno comprometidos, incluso en presencia de una inmunidad pre-existente al poxvirus en estos animales o humanos. Particularmente interesante fue, que el virus de acuerdo a la presente invención puede reactivar respuestas inmunes también en animales o humanos que son sometidos a una terapia antiviral, por ejemplo, anti-retroviral. “Terapia antiviral” incluye conceptos terapéuticos para eliminar o suprimir la infección viral incluyendo, por ejemplo, (i) la aplicación de análogos nucleotídicos, (ii) la aplicación de inhibidores de la actividad enzimática viral o ensamblaje viral, o (iii) aplicación de citocinas para influir en las respuestas inmunes del hospedero.

De acuerdo aún a una realización adicional la vacuna es especialmente, pero no exclusivamente, aplicable en el campo de la veterinaria, por ejemplo, para la inmunización contra la infección pox animal. En animales pequeños la inoculación para la inmunización es preferiblemente realizad de manera parenteral o nasal, mientras en animales más grandes o humanos la inoculación subcutánea, intramuscular u oral es preferida.

Ha sido encontrado por los inventores que ya una dosis de vacuna que contiene una dosis efectiva de solamente 10^2 $TCID_{50}$ (dosis infecciosa del cultivo del tejido) del virus de acuerdo a la presente invención es suficiente para inducir inmunidad completa contra un desafío del virus vaccinia tipo salvaje en ratones. Esto es particularmente sorprendente ya que tal alto grado de atenuación del virus de acuerdo a la presente invención se esperaría que influyera negativamente y, de esta manera, reduciría su inmunogenicidad. Tal expectativa está basada en la creencia de que para la inducción de una respuesta inmune los epítopos antigénicos necesitan estar presentes en el sistema inmune en cantidad suficiente. Un virus que está altamente atenuado y, de esta manera, no replicante puede solamente presentar una muy pequeña cantidad de epítopos antigénicos, o sea tanto como ellos mismos incorporen. Esta cantidad de antígeno, portado por las partículas virales, no fue considerada suficiente para la inducción de una respuesta inmune potente. Sin embargo, el virus de acuerdo a la invención estimula incluso con una dosis efectiva muy baja de solamente 10^2 $TCID_{50}$ una respuesta inmune potente y de protección en un modelo de desafío ratón/vaccinia. El virus de acuerdo a la presente invención muestra así una inmunogenicidad inesperada e incluso incrementada comparada con otras cepas del MVA caracterizadas hasta ahora. La alta inmunogenicidad hace que el virus de acuerdo a la presente invención y cualquier vacuna derivada del mismo sea especialmente útil para la aplicación en humanos o animales inmuno comprometidos.

De acuerdo a aún otra realización de la invención, el virus es usado como un adyuvante. Un “adyuvante” en el contexto de la presente descripción se refiere a un intensificador de la respuesta inmune específica en las vacunas.

"Usar el virus como adyuvante" significa incluir el virus en una vacuna pre-existente para estimular adicionalmente el sistema inmune del paciente que recibe la vacuna. El efecto de inmunización de un epítopo antigénico es en la mayoría de las vacunas frecuentemente intensificado por la adición del así llamado adyuvante. Un adyuvante co-estimula el sistema inmune provocando una reacción inmune específica más fuerte contra un epítopo antigénico de una vacuna. Esta estimulación puede ser regulada por factores del sistema inmune no específico, tal como el interferón y la interleucina.

Por lo tanto, en una realización adicional de la invención, el virus es usado en mamíferos incluyendo humanos para activar, apoyar o inhibir el sistema inmune, y preferiblemente para activar la respuesta inmune contra cualquier determinante antigénico. El virus puede también ser usado para apoyar al sistema inmune en una situación de susceptibilidad incrementada contra infecciones tal como en el caso del estrés.

El virus usado como un adyuvante puede ser un virus no recombinante, es decir un virus que no contiene ADN heterólogo en su genoma. Un ejemplo para este tipo de virus es el MVA-BN. Alternativamente el virus que es usado como un adyuvante es un virus recombinante que contiene en su genoma secuencias de ADN heterólogas que no están presentes de manera natural en el genoma viral. Para ser usado como adyuvante el ADN viral recombinante del virus preferiblemente contiene y expresa genes que codifican para proteínas o péptidos inmuno estimulantes tal como las interleucinas.

De acuerdo a una realización adicional es preferido que el virus sea inactivado, cuando es usado como adyuvante o adicionado a otra vacuna. La inactivación del virus puede ser realizada, por ejemplo, por calor o con químicos, como es conocido en el arte. Preferiblemente, el virus es inactivado con β-propriolactona. De acuerdo a esta realización de la invención, el virus inactivado puede ser añadido a las vacunas contra numerosas enfermedades infecciosas o proliferativas para incrementar la respuesta inmune del paciente a esta enfermedad. En resumen la invención comprende las realizaciones listadas en el juego de reivindicaciones, solas o en combinación.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Cinéticas del crecimiento de diferentes cepas del MVA en diferentes líneas celulares. En la parte A) los resultados están agrupados de acuerdo a las cepas de MVA probadas mientras en la parte B) los resultados están agrupados de acuerdo a las líneas celulares probadas. B) La cantidad de virus recuperada de una línea celular después de cuatro días (D4) del cultivo fue determinada por ensayo de placa y expresada como la proporción de virus recuperado después de cuatro días con relación al inoculo inicial en el día 1 (D1).

Figura 2: Protección proporcionada contra un desafío letal de vaccinia a continuación de las vacunaciones con MVA-BN o MVA 575. La protección es medida por la reducción en los títulos de ovarios determinada 4 días posteriores al desafío por medio del ensayo de placa estándar.

Figura 3: Inducción de CTL y protección proporcionada contra un desafío de influenza usando diferentes regímenes de inoculación primaria-reactivación.

3A: Inducción de respuestas CTL a 4 epítopos H-2^d restringidos diferentes a continuación de vacunaciones con diferentes combinaciones de vacunas de ADN o MVA-BN que codifican un polítopo murino. Ratones BALB/c (5 por grupo) fueron vacunados con ADN (de manera intramuscular) o MVA-BN (de manera subcutánea) y recibieron inmunizaciones de reactivación tres semanas más tarde. Las respuestas CTL a 4 epítopos diferentes codificados por las vacunas (TYQRTRALV, influenza; SYIPSAEKI, *P. Berghei*; YPHFMPTNL, Citomegalovirus; RPQASGVYM, LCV) fueron determinados usando un ensayo ELISPOT 2 semanas posteriores a las inmunizaciones de reactivación.

3B: Inducción de respuestas CTL a 4 epítopos diferentes a continuación de vacunaciones con diferentes combinaciones de vacunas de ADN o MVA-BN que codifican un polítopo murino. Ratones BALB/c (5 por grupo) fueron vacunados con ADN (de manera intramuscular) o MVA-BN (de manera intravenosa) y recibieron inmunizaciones de reactivación tres semanas más tarde. Las respuestas CTL a 4 epítopos diferentes codificados por las vacunas (TYQRTRALV, influenza; SYIPSAEKI, *P. Berghei*; YPHFMPTNL, Citomegalovirus; RPQASGVYM, LCV) fueron determinados usando un ensayo ELISPOT 2 semanas posteriores a las inmunizaciones de reactivación.

3C: La frecuencia del péptido y de las células T específicas del MVA a continuación de la inoculación primaria-reactivación homóloga usando una dosis óptima (1 x 10^8 $TCID_{50}$) del MVA-BN recombinante, entregada de manera subcutánea. Grupos de 8 ratones fueron vacunados con dos dosis de las combinaciones que se indican en la figura. Dos semanas posteriores a la vacunación final el número de esplenocitos de péptidos específicos fueron medidos usando un ensayo IFN-gamma ELISPOT. La barras representan el número promedio de manchas específicas más/menos las derivaciones estándares del promedio.

Figura 4: Carga del SIV de monos vacunados con MVA-BN nef o MVA-BN.

Figura 5: Supervivencia de los monos vacunados a continuación de la infección con el SIV.

Figura 6: Títulos de anticuerpo de suero de mono para el MVA-BN. Los títulos de anticuerpo para cada animal son mostrados como formas diferentes, mientras el título promedio es ilustrado como un rectángulo sólido.

Figura 7: Niveles del SIV en monos inmuno comprometidos (CD4 < 400 ml de sangre) a continuación de las vacunaciones con MVA-BN que codifica para tat. Los monos han recibido previamente tres vacunaciones con el MVA-BN o el MVA-BN nef (semana 0, 8, 16) y habían sido infectado con un aislado patogénico de SIV (semana 22). En la semana 100, 102 y 106 (indicada por las flechas) los monos fueron vacunados con MVA-BN tat.

Figura 8: Niveles del SIV en monos que son sometidos a terapia y vacunaciones terapéuticas usando MVA-BN. Tres grupos de monos (n=6) fueron infectados con el SIV y tratados diariamente con PMPA (indicado por la línea negra). En la semana 10 y 16 los animales fueron vacunados (indicado por flechas) con mezclas del MVA recombinante o solución salina

Figura 9: Respuesta humoral generada para el SIV a continuación de la infección y las vacunaciones con el MVA recombinante. Tres grupos (n=6) de monos fueron infectados con un aislado patogénico del SIV (semana 0) y luego tratados con terapia anti-retroviral (PMPA; indicado por la línea negra). Los monos fueron vacunados con mezclas del MVA recombinante o solución salina en la semana 10 y 16. Los anticuerpos para el SIV fueron determinados usando lisados de células T infectadas como antígenos en un ELISA estándar.

Figura 10: Respuesta humoral generada para el MVA en monos infectados con el SIV que son sometidos a terapia anti-retroviral. Tres grupos (n=6) de monos fueron infectados con un aislado patogénico del SIV (semana 0) y luego tratados con la terapia anti-retroviral (PMPA; indicado por la línea negra). Los monos fueron vacunados con mezclas del MVA recombinante o solución salina en la semana 10 y 16. Los anticuerpos para MVA fueron determinados usando un ELISA de captura estándar para el MVA.

Figura 11: Inducción de anticuerpos para el MVA a continuación de la vacunación de ratones con diferentes vacunas de la viruela. Los niveles de anticuerpos generados para el MVA a continuación de las vacunaciones con el MVA-BN (semana 0 y 4), fueron comparados con cepas de vaccinia convencionales, Elstree y Wyeth, dadas por medio de la escarificación de la cola (semana 0), MVA 572 (semana 0 y 4) y MVA-BN y MVA 572 dadas como una vacuna pre-Elstree. La MVA 572 ha sido depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales como ECACC V94012707. Los títulos fueron determinados usando un ELISA de captura y calculados por regresión lineal usando la parte lineal del gráfico y definido como la dilución que resultó en una densidad óptica de 0.3. * MVA-BN : MVA-BN es significativamente ($p > 0.05$) diferente a MVA 572 : MVA 572.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustraran adicionalmente la presente invención. Será bien entendido por una persona experta en el arte que los ejemplos proporcionados de ningún modo pueden ser interpretados de una manera que limite la aplicabilidad de la tecnología proporcionada por la presente invención a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Cinéticas del crecimiento de una nueva cepa del MVA en líneas celulares seleccionadas y replicación in vivo

(i) Cinéticas del crecimiento en líneas celulares:

Para caracterizar una cepa nueva aislada de acuerdo a la presente invención (posteriormente referida como MVA-BN) las cinéticas del crecimiento de esta nueva cepa fueron comparadas con aquellas de otras cepas del MVA, que ya han sido caracterizadas.

El experimento fue hecho comparando las cinéticas del crecimiento de los siguientes virus en las líneas celulares y células primarias subsiguientemente listadas:

MVA-BN (Stock de virus #23, 18. 02. 99 crudo, titulado en $2{,}0 \times 10^7$ $TCID_{50}$/ml);

MVA como es caracterizada por Altenburger (patente US 5, 185, 146) y posteriormente referida como MVA-HLR;

MVA (pasaje 575) como es caracterizada por Anton Mayr (Mayr, A., *y otros* [1975] Infection 3; 6-14) y posteriormente referida como MVA-575 (ECACC V00120707); y

MVA-Vero como es caracterizada en la Solicitud Internacional de Patente PCT/EP01/02703 (WO 01/68820) (Stock de virus, pasaje 49, #20, 22.03.99 crudo, titulado en $4{,}2 \times 10^7$ $TCID_{50}$/ml).

Las líneas celulares y células primarias usadas fueron:

<u>CEF</u> Fibroblastos de embrión de pollo (preparados de forma fresca a partir de huevos de SPF)

<u>HeLa</u> Adenocarcinoma cervical humano (epitelial), ATCC No. CCL-2;

<u>143B</u> Osteosarcoma del hueso humano TK-, ECACC No. 91112502;

<u>HaCat</u> Línea celular del queratinocito humano, Boukamp y otros 1988, J Cell Biol. 106(3): 761-771;

BHK Riñón de hámster bebé, ECACC 85011433;

Vero Fibroblastos de riñón de mono verde africano, ECACC 85020299;

CV1 Fibroblastos de riñón de mono verde africano, ECACC 87032605.

Para la infección las diferentes células fueron sembradas en placas de 6 cavidades a una concentración de 5 x 10^5 células/cavidades e incubadas durante toda la noche a 37ºC, 5% de CO_2 en DMEM (Gibco, Cat. No.61965-026) más 2% de FCS. El medio de cultivo de células fue removido y las células fueron infectadas en aproximadamente 0.05 moi por una hora a 37ºC, 5% de CO_2 (para la infección se asume que el número de células se duplicaron durante toda la noche). La cantidad de virus usado para cada infección de los diferentes tipos de células fue 5 x 10^4 $TCID_{50}$ y esto será referido como Entrada. Las células fueron entonces lavadas 3 veces con DMEM y finalmente 1 ml de DMEM, 2% de FCS fueron añadidos y las placas fueron dejadas incubar por 96 horas (4 días) a 37ºC, 5% de CO_2. Estas infecciones fueron detenidas congelando las placas a –80ºC listas para el análisis de titulación.

Análisis de titulación (inmuno teñido con un anticuerpo específico para el virus vaccinia)

Para la titulación de una cantidad de virus células de prueba (CEF) fueron sembradas en placas de 96 cavidades en RPMI (Gibco, Cat. No. 61870-010), 7% de FCS, 1% de Antibiótico/ Antimicótico (Gibco, Cat. No. 15240-062) a una concentración de 1 x 10^4 células/cavidad e incubadas durante toda la noche a 37ºC, 5% de CO_2. Las placas de 6 cavidades que contenían los experimentos de la infección fueron congelados/descongelados 3 veces y diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} fueron preparadas usando el medio de crecimiento RPMI. Las diluciones del virus fueron distribuidas sobre las células de prueba e incubadas por 5 días a 37ºC, 5% de CO_2 para permitir el desarrollo del CPE (efecto citopático). Las células de prueba fueron fijadas (Acetona/Metanol 1:1) por 10 min, lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo específico del virus vaccinia policlonal (Quartett Berlin, Cat. No. 9503-2057) en una dilución 1:1000 en buffer de incubación por una hora a TA. Después de lavar dos veces con PBS (Gibco, Cat. No. 20012-019) el anticuerpo de conejo anti HPR acoplado (Promega Mannheim, Cat. No. W4011) fue añadido a una dilución 1:1000 en buffer de incubación (PBS que contiene 3% de FCS) por una hora a TA. Las células fueron lavadas nuevamente dos veces con PBS e incubadas con solución de teñido (10 ml de PBS + 200 µl de solución saturada de o-dianisidina en 100% de etanol + 15 µl de H_2O_2 preparada de manera fresca) hasta que manchas pardas fueran visibles (dos horas). La solución de teñido fue removida y el PBS fue añadido para detener la reacción del teñido. Todas las cavidades que mostraron una mancha parda fueron marcadas como positivas para CPE y el título fue calculado usando la fórmula de Kaerber (ensayo basado en $TCID_{50}$) (Kaerber, G. 1931. Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 162, 480)

Los virus fueron usados para infectar los juegos duplicados de por una parte CEF y BHK, los cuales se esperaba fueran tolerantes al MVA, y por otra parte CV-1, Vero, Hela, 143B y HaCat los cuales se esperaba no fueran tolerantes al MVA, a una multiplicidad baja de la infección, es decir 0.05 unidades infecciosas por célula (5 x 10^4 $TCID_{50}$). Después de esto, el inóculo del virus fue removido y las células lavadas tres veces para remover cualquier virus remanente no absorbido. Las infecciones fueron dejadas por un total de 4 días donde los extractos virales fueron preparados y luego titulados en células de CEF. La Tabla 1 y la Figura 1 muestran los resultados de los ensayos de titulación donde los valores son dados como la cantidad total de virus producidos después de 4 días de infección.

Fue mostrado que todos los virus amplificaron bien en las células de CEF (Fibroblastos de embrión de pollo) como se esperaba ya que esta es una línea celular tolerante a todos los MVA. Adicionalmente fue mostrado que todos los virus amplificaron bien en BHK (Línea celular de riñón de hámster). La MVA-Vero realizó la mejor, ya que BHK es una línea celular tolerante.

Concerniente a la replicación en células Vero (Línea celular de riñón de mono) la MVA-Vero amplificó bien como se esperaba específicamente 1000 veces por encima de la Entrada. La MVA-HLR y también la MVA-575 amplificaron bien con 33 veces y 10 veces de incremento por encima de la Entrada, respectivamente. Solamente se encontró que la MVA-BN no amplificó tan bien en estas células en comparación con las otras, específicamente solamente se incremento en 2 veces por encima de la Entrada.

También concerniente a la replicación en células CV1 (Línea celular de riñón de mono) fue encontrado, que la MVA-BN está altamente atenuada en esta línea celular. Este mostró un decrecimiento de 200 veces por debajo de la Entrada. Tampoco la MVA-575 amplificó por encima del nivel de Entrada también mostrado como una amplificación ligeramente negativa, específicamente un decrecimiento de 16 veces por debajo de la Entrada. La MVA-HLR fue la que mejor amplificó con un incremento de 30 veces por encima de la Entrada, seguido por la MVA-Vero con un incremento de 5 veces por encima de la Entrada.

Lo más interesante es comparar las cinéticas del crecimiento de varios virus en líneas celulares humanas. Con respecto a la replicación reproductiva en las células 143B (línea celular del cáncer de hueso humano) fue mostrado que la MVA-Vero fue la única que mostró amplificación por encima de la Entrada (un incremento de 3 veces). Todos los otros virus no amplificaron por encima de la Entrada pero hubo una gran diferencia entre la MVA-HLR y la MVA-BN y la MVA-575. La MVA-HLR estuvo “en la frontera” (decrecimiento en 1 vez por debajo de la Entrada), mientras la MVA-BN mostró la atenuación más grande (decrecimiento de 300 veces por debajo de la Entrada) seguido por la

MVA-575 (decrecimiento de 59 veces por debajo de la Entrada). Para resumir la MVA-BN es superior con respecto a la atenuación en células 143B humanas.

Además, concerniente a la replicación en células HeLa (células del cáncer cervical humano) fue mostrado que la MVA-HLR amplificó bien en esta línea celular, y aún mejor que en las células de BHK tolerantes (Hela = incremento de 125 veces por encima de la Entrada; BHK = incremento de 88 veces por encima de la Entrada). La MVA-Vero también amplificó en esta línea celular (incremento de 27 veces por encima de la Entrada). Sin embargo, la MVA-BN y también en una extensión menor la MVA-575 fueron atenuadas en estas líneas celulares (MVA-BN = decrecimiento de 29 veces por debajo de la Entrada y MVA-575 = decrecimiento de 6 veces por debajo de la Entrada).

Concerniente a la replicación en las células HaCat (línea celular del queratinocito humano) fue mostrado que la MVA-HLR amplificó bien en esta línea celular (incremento de 55 veces por encima de la Entrada). Tanto la MVA-Vero adaptada como la MVA-575 mostraron amplificación en esta línea celular (incremento de 1.2 y 1.1 veces por encima de la Entrada respectivamente). Sin embargo, la MVA-BN fue la única que demostró atenuación (decrecimiento de 5 veces por debajo de la Entrada).

En conclusión puede ser establecido que la MVA-BN es la cepa de virus más atenuada en este grupo de virus: la MVA-BN demostró estar extremadamente atenuada en líneas celulares humanas mostrando una proporción de amplificación de 0.05 a 0.2 en células de riñón de embrión humano (293: ECACC No. 85120602) (datos no incorporados en la Tabla 1), muestra además una proporción de amplificación de alrededor de 0.0 en las células 143B; una proporción de amplificación de alrededor de 0.04 en células HeLa; una proporción de amplificación de alrededor de 0.22 en células HaCat. Adicionalmente, la MVA-BN está mostrando una proporción de amplificación de alrededor de 0.0 en células CV1. Solamente en las células Vero la amplificación puede ser observada (proporción de 2.33), sin embargo, no en la misma extensión que lo es en las líneas celulares tolerantes tal como BHK y CEF (compare con la Tabla 1). Así, la MVA-BN es la única cepa del MVA conocida que muestra una proporción de amplificación de menos que 1 en todas las líneas celulares humanas 143B, Hela, HaCat y 293.

La MVA-575 muestra un perfil similar a la MVA-BN pero no está tan atenuada como la MVA-BN.

La MVA-HLR amplificó bien en todas las líneas celulares probadas (excepto para las células de 143B), de esta manera puede ser considerado como competente para la replicación en todas las líneas celulares probadas con excepción de las células de 143B. En un caso incluso amplificó mejor en una línea celular humana (HeLa) que en una línea celular tolerante (BHK).

La MVA-Vero si muestra amplificación en todas las líneas celulares pero en una extensión menor que la demostrada por la MVA-HLR (ignorando el resultado de 143B). No obstante no puede ser considerado como de la misma “clase”, con respecto a la atenuación, que la MVA-BN o la MVA-575.

2. Replicación in vivo

Dado que algunas cepas del MVA claramente se replican *in vitro* la capacidad de diferentes cepas del MVA fue examinada para replicarse *in vivo* usando un modelo de ratón transgénico AGR129. Esta cepa de ratón tiene disrupciones marcadas de genes en los genes receptores IFN tipo I (IFN-α/β) y tipo II (IFN-γ) y en *RAG.* Debido a estas disrupciones los ratones no tienen sistema IFN y no son capaces de producir células T y B maduras y como tal están severamente inmuno comprometidos y altamente susceptibles a un virus replicante. Grupos de seis ratones fueron inmunizados (i.p.) con 10^7 pfu de MVA-BN, MVA-HLR o NVA 572 (usado en 120,000 personas en Alemania) y monitoreado diariamente para signos clínicos. Todos los ratones vacunados con MVA HLR o MVA 572 murieron dentro de 28 y 60 días, respectivamente. En la autopsia habian signos generales de infección viral severa en la mayoría de los órganos y por un ensayo de placa estándar el MVA (10^8 pfu) fue recuperado de los ovarios. Por el contrario, los ratones vacunados con la misma dosis del MVA-BN (que corresponde a la cepa depositada ECACC V00083008) sobrevivieron por más de 90 días y no pudo recuperarse MVA de los órganos o tejidos.

Cuando son tomados juntos los datos de los estudios *in vitro* e *in vivo* claramente demuestran que la MVA-BN está más altamente atenuada que la cepa madre MVA-HLR comercial.

Ejemplo 2

Datos inmunológicos e in vivo

Estos experimentos fueron realizados para comparar regímenes de vacunación y dosis diferentes del MVA-BN en comparación con otros MVA.

2.1. Cepas Diferentes del MVA Difieren en su Capacidad para Estimular la Respuesta Inmune.

Las cepas de vaccinia competentes a la replicación inducen respuestas inmunes potentes en ratones y a altas dosis son letales. Aunque las MVA están altamente atenuados y tienen una capacidad reducida para replicarse en células de mamíferos, existen diferencias en la atenuación entre cepas diferentes del MVA. Verdaderamente, la MVA BN

parece estar más atenuada que otras cepas del MVA, incluso la cepa paternal MVA 575. Para determinar si esta diferencia en la atenuación afecta la eficacia de la MVA para inducir respuestas inmuno protectoras, diferentes dosis de la MVA BN y de la MVA 575 fueron comparadas en un modelo de desafío con vaccinia letal. Los niveles de protección fueron medidos por una reducción en lo títulos de vaccinia en los ovarios determinados 4 días posteriores al desafío, ya que esto permite una valoración cuantitativa de las diferentes dosis y cepas del MVA.

Modelo de Desafío Letal

Ratones BALB/c (H-2^d) hembras de 6-8 semanas libres de patógenos específicos (n=5) fueron inmunizados (i.p.) con diferentes dosis (10^2, 10^4 o 10^6 $TCID_{50}$/ml) de MVA BN o de MVA 575. La MVA-BN y la MVA-575 habían sido propagadas en células de CEF, y habían sido purificadas en sucrosa y formuladas en Tris pH 7.4. Tres semanas más tarde los ratones recibieron una reactivación de la misma dosis y cepa del MVA, que fue seguido dos semanas después por un desafío letal (i.p.) con una cepa de vaccinia competente a la replicación. Como virus vaccinia competente a la replicación (abreviado como "rVV") fueron usadas la cepa WR-L929 TK+ o la cepa IHD-J. Los ratones de control recibieron una vacuna placebo. La protección fue medida por la reducción en los títulos en los ovarios determinada 4 días posteriores al desafío por medio del ensayo de placa estándar. Para esto los ratones fueron sacrificados el día 4 posteriores al desafío y los ovarios fueron removidos, homogenizados en PBS (1ml) y los títulos virales determinados por ensayo de placa estándar usando células VERO (Thomson *y otros*, 1998, J. Immunol. 160: 1717).

Los ratones vacunados con dos inmunizaciones de 10^4 o 10^6 $TCID_{50}$/ml de MVA-BN o MVA-575 estaban completamente protegidos a juzgar por un 100% de reducción en los títulos de rVV en los ovarios 4 días posteriores al desafío (Fig. 2). El virus del desafío fue aclarado. Sin embargo, diferencias en los niveles de protección proporcionados por la MVA-BN o la MVA-575 fueron observadas en dosis más pequeñas. Los ratones que recibieron dos inmunizaciones de 10^2 $TCID_{50}$/ml de MVA 575 no estaban protegidos a juzgar por los títulos altos de rVV en los ovarios (promedio 3.7 $x10^7$ pfu +/- 2.11 $x10^7$). Por el contrario, los ratones vacunados con la misma dosis de MVA-BN indujeron una reducción significativa (96%) en los títulos de rVV en los ovarios (promedio 0.21 $x10^7$ pfu +/- 0.287 $x10^7$). Los ratones control que recibieron una vacuna placebo tuvieron un título viral promedio de 5.11 $x10^7$ pfu (+/- 3.59 $x10^7$)(Fig. 2).

Ambas cepas del MVA inducen respuestas inmuno protectoras en los ratones contra un desafío del rVV letal. Aunque ambas cepas del MVA son igualmente eficientes en altas dosis, diferencias en su eficacia son claramente evidentes en dosis sub-óptimas. La MVA-BN es más potente que su cepa madre MVA-575 induciendo una respuesta inmuno protectora contra un desafío del rVV letal, la que puede estar relacionada con la atenuación incrementada de la MVA-BN en comparación con la MVA-575.

2.2 La MVA-BN en Regímenes de Vacunación Primaria-Reactivación

2.2.1: Inducción de anticuerpos para el MVA a continuación de la vacunación de ratones con diferentes vacunas de viruela.

La eficacia de la MVA-BN fue comparada con otras cepas de MVA y de vaccinia previamente usadas en la erradicación de la viruela. Estos incluyeron inmunizaciones simples usando cepas de vaccinia de Elstree y Wyeth producidas en células de CEF y entregadas por medio de la escarificación de la cola e inmunizaciones usando la MVA 572 que fue previamente usada en el programa de erradicación de la viruela en Alemania. En adición, la MVA-BN y la MVA 572 fueron comparadas como una pre-vacuna seguido por Elstree por medio de la escarificación. Para cada grupo ocho ratones BALB/c fueron usados y todas las vacunaciones con MVA (1 $x10^7$ $TCID_{50}$) fueron entregadas de manera subcutánea en la semana 0 y la semana 3. Dos semanas a continuación de la inmunización de reactivación los ratones fueron desafiados con vaccinia (IHD-J) y los títulos en los ovarios fueron determinados 4 días posteriores al desafío. Todas las vacunas y regímenes indujeron 100% de protección.

Las respuestas inmunes inducidas usando estos regímenes o vacunas diferentes fueron medidas en animales antes del desafío. Ensayos para medir los niveles de anticuerpos de neutralización, la proliferación de células T, la producción de citocina (IFN-γ vs IL-4) y la producción de IFN-γ por células T fueron usados. El nivel de las respuestas de las células T inducidas por el MVA-BN, medido por ELIspot, fue generalmente equivalente a otros MVA y virus vaccinia demostrando bio-equivalencia. Un análisis semanal de los títulos de anticuerpo para MVA a continuación de los regímenes de vacunación diferentes reveló que las vacunaciones con MVA-BN mejoraron significativamente la velocidad y la magnitud de la respuesta del anticuerpo en comparación con otros regímenes de vacunación (Fig. 11). Verdaderamente los títulos de anticuerpo para el MVA fueron significativamente más altos ($p>0.05$) en las semanas 2, 4 y 5 (1 semana posterior a la reactivación en la semana 4) cuando fueron vacunados con la MVA-BN en comparación con los ratones vacunados con la MVA 572. A continuación de la vacunación de reactivación en la semana 4 los títulos de anticuerpo fueron también significativamente más altos en el grupo de la MVA-BN en comparación con los ratones que recibieron una vacunación simple con cepas de vaccinia de Estree o Wyeth. Estos resultados demuestran claramente que dos vacunaciones con MVA-BN indujeron a una respuesta superior del anticuerpo comparados con la vacunación simple clásica con cepas de vaccinia tradicionales tradicionales (Elstree y Wyeth) y confirman los descubrimientos de la sección 1.5 de que la MVA-BN es más inmunogénica que otras cepas del MVA.

2.2.2: Los regímenes de inoculación primaria de MVA y reactivación con MVA generan el mismo nivel de protección que los regímenes de inoculación primaria de ADN reactivación con MVA en un modelo de desafío de la influenza.

La eficacia de los regímenes de inoculación primaria reactivación con MVA para generar respuestas CTL de afinidad alta fue evaluada y comparada con los regímenes de inoculación primaria de ADN reactivación con MVA que han sido reportados como superiores. Los regímenes diferentes fueron evaluados usando una construcción de polítopo murino codificada por un vector del ADN o el MVA-BN y los niveles de inducción de CTL fueron comparados por medio de ELISPOT, mientras la afinidad de la respuesta fue medida como el grado de protección proporcionado a continuación de un desafío con influenza.

Construcciones

El plásmido del ADN que codifica para el polítopo murino (10 epítopos de CTL incluyendo influenza, ovoalbúmina) fue descrito previamente (Thomson *y otros* 1998, J.Immunol. 160: 1717). Este polítopo murino fue insertado en el sitio II de eliminación de la MVA-BN, propagado en células de CEF, purificado con sucrosa y formulado en Tris pH 7.4.

Protocolos de vacunación

En el estudio corriente fueron usados ratones BALB/c (H-2d) hembras de 6-8 semanas libres de patógenos específicos. Grupos de 5 ratones fueron usados para el análisis de ELISPOT mientras 6 ratones por grupo fueron usados para los experimentos de desafío con influenza. Los ratones fueron vacunados con diferentes regímenes de inoculación primaria reactivación usando el MVA o el ADN que codifica para el polítopo murino como se detalla en los resultados. Para las inmunizaciones con ADN, los ratones fueron anestesiados y luego se les puso una inyección simple de 50 µg de ADN de plásmido libre de endo-toxina (en 50 µl de PBS) en los músculos cuadriceps bajo anestesia. Inmunizaciones primarias usando MVA fueron hechas por administración intravenosa de 10^7 pfu de MVA-BN por ratón o por administración subcutánea de 10^7 pfu o 10^8 pfu de MVA-BN por ratón. Inmunizaciones de reactivación fueron realizadas tres semanas posteriores a las inmunizaciones primarias. La reactivación con ADN del plásmido fueron hechas de la misma manera que la inmunización primaria con ADN (ver anteriormente). Para establecer ensayos ELISPOT estándares de respuestas CTL (Schneider *y otros*, 1998, Nat. Med. 4; 397-402) fueron realizados en esplenocitos 2 semanas posteriores a la última inmunización de reactivación usando el péptido del epítopo de CTL de la influenza (TYQRTRALV), el péptido del epítopo de P. Berghei (SYIPSAEKI), el epítopo del péptido del Citomegalovirus (YPHFMPTNL) y/o el epítopo del péptido del LCV (RPQASGVYM).

Para los experimentos de desafío los ratones fueron anestesiados e infectados por vía i.n. con una dosis sub-letal del virus de la influenza ressortant, Mem71 (4.5 x10^5 pfu en 50ml de PBS). Al día 5 posterior a la infección, los pulmones fueron removidos y títulos virales fueron determinados en duplicado en la línea celular de riñón canino Madin-Darby usando un ensayo de placa de influenza estándar.

Resultados:

Usando la vacuna del ADN sola la inducción de CTL para los epítopos 4 H-2^d codificados por el polítopo murino fue pobre y solamente respuestas débiles pudieron ser detectadas para dos de los epítopos para *P. Berghei* (SYIPSAEKI) y el virus de la choriomeningitis linfocítica (RPQASGVYM). Por el contrario, usando un régimen de inoculación primaria de ADN reactivación con MVA (10^7 pfu de MVA-BN entregada de manera subcutánea) hubo significativamente más CTL inducida para SLY (incremento de 8 veces) y RPQ (incremento de 3 veces) y las respuestas fueron también observadas para un tercer epítopo para el citomegalovirus murino (YPHFMPTNL) (Fig. 3A). Sin embargo, usando 10^7 pfu de MVA-BN entregadas de manera subcutánea en un régimen de inoculación primaria reactivación homólogo indujo el mismo nivel de respuestas que el de ADN seguido por el MVA-BN (Fig. 3A). Sorpresivamente, no hubo diferencia significativa en los números de CTL inducidos para los tres epítopos cuando una inmunización de MVA-BN (10^7 $TCID_{50}$) fue usada, indicando que una inmunización secundaria con MVA-BN no reactivó significativamente las respuestas CTL.

La administración subcutánea de 10^7 pfu de MVA ha sido previamente mostrada como la ruta más eficiente y de mayor concentración de virus para la vacunación usando otras cepas del MVA, particularmente si se compara con las inmunizaciones intravenosas (Schneider y otros 1998). Para definir los regímenes de inmunización óptima el experimento anterior fue repetido cambiando la cantidad de virus o cambiando el modo de administración. En un experimento vacunaciones de 10^7 pfu de MVA-BN fueron hechas de manera intravenosa (Fig. 3B). En un experimento adicional 10^8 pfu de MVA-BN fueron administradas de manera subcutánea (Fig. 3C). En estos experimentos las inmunizaciones de inoculación primaria reactivación con MVA-BN indujeron números altos de CTL promedio para los tres epítopos de CTL comparados con los regímenes de inoculación primaria de ADN reactivación con MVA. También por el contrario de la inmunización de 10^7 pfu de MVA-BN entregadas de manera subcutánea la inmunización con 10^7 pfu de MVA-BN entregadas de manera intravenosa y la inmunización con 10^8 pfu entregadas de manera subcutánea reactivó significativamente las respuestas CTL, indicando claramente que la MVA-BN puede ser usada para reactivar respuestas CTL en presencia de una inmunidad pre-existente para el vector.

2.2.3.: Eficacia de una Vacuna de MVA-BN nef en Monos Rhesus Infectados con el SIV.

Determinar la eficacia de una vacuna de MVA-BN nef evaluando la carga viral y el retraso de la enfermedad a continuación de un desafío con un aislado primario virulento del SIV. Además, el estudio determinará si la MVA-BN puede ser usada para reactivar de manera segura las respuestas inmunes en monos inmuno comprometidos con una inmunidad pre-existente al MVA.

Protocolos de vacunación

Dos grupos (n = 6) de monos rhesus (Macaca mulalta) fueron vacunados con una inyección bolus intramuscular con la MVA-BN sola o una MVA-BN nef recombinante en la semana 0, 8 y 16. En la semana 22 todos los monos fueron desafiados con 50 MID_{50} de un stock del SIV asociado a células patogénicas (1XC) a partir de PBMC de monos rhesus no cultivado, primario por la vía intravenosa. El estado clínico de los animales fue frecuentemente monitoreado y muestras regulares de sangre fueron tomadas para la medición de la viremia, los parámetros de inmunidad, y un rango total de parámetros de química clínica de la sangre y hematología. De los animales fueron sacrificados los que desarrollaron SIDA como enfermedad y los monos sobrevivientes fueron monitoreados por 99 semanas posteriores a la vacunación. En la semana 100 los monos sobrevivientes fueron todos inmunizados por vía i.m. con la MVA-BN tat y recibieron inmunizaciones adicionales con la misma MVA-BN tat en las semanas 102 y 106.

Ningún efecto adverso fue observado a continuación de cualquiera de las vacunaciones con MVA-BN o MVA-BN nef. A continuación de la infección de los monos con el SIV los niveles de viremia se elevaron de forma aguda y llegaron a un pico dos semanas posteriores a la infección (Fig. 4). Debido a la gran desviación estándar dentro de los grupos no hubo una diferencia significativa en los niveles promedios del SIV entre los grupos vacunados con MVA-BN nef o MVA-BN. Sin embargo, hubo una carga general de 10 veces menos SIV en el grupo vacunado con la MVA-BN nef en comparación con el grupo control (MVA-BN). Además, después de 35 semanas a continuación de la infección (el período inicial de observación) solamente 1 de los seis monos vacunados con MVA-BN nef se le tuvo que aplicar la eutanasia debido a la severidad de la enfermedad, en comparación con los 4 de los 6 animales en el grupo de control (Fig. 5). El desarrollo de la enfermedad claramente estuvo relacionado con una carga viral más alta y como tal los animales fueron observados por 29 semanas adicionales posteriores a la infección. La vacuna con MVA-BN nef pareció retrasar la progresión de la enfermedad, en comparación con el grupo control e incluso en la semana 46 posterior a la infección 5 de los 6 animales con MVA-BN nef sobrevivieron (Fig. 5). Sin embargo, para la semana 59 posterior a la infección a dos animales adicionales en el grupo vacunado con el nef tuvo que aplicársele la eutanasia dejando cinco animales sobrevivientes (tres del grupo de MVA-BN nef y dos vacunados con MVA-BN). Un examen de los títulos de anticuerpo generados para la MVA-BN en estos 12 monos demostró claramente que la MVA-BN puede reactivar la respuesta inmune incluso en presencia de una inmunidad al MVA pre-existente (Fig. 6). A continuación de la inmunización primaria con MVA-BN o MVA-BN nef todos los monos generaron una respuesta de anticuerpos al MVA con un título promedio de 1000. Esta respuesta de anticuerpos fue significativamente reactivada a continuación de la inmunización secundaria, demostrando claramente que el MVA puede ser usado para respuestas inmune a la inoculación primaria-reactivación en monos sanos. Estos títulos de anticuerpo declinaron gradualmente, aunque para la semana 49 posterior a la inmunización los títulos se estabilizaron, de manera tal que los títulos promedios para el MVA en la semana 99 fueron 2000.

Los cinco monos sobrevivientes fueron infectados con el SIV e inmuno comprometidos con conteos CD4 de sangre menores de 400/µl. Para investigar el impacto del uso de la MVA-BN en monos inmuno comprometidos los cinco animales fueron vacunados tres veces con MVA-BN tat en la semana 100, 102 y 106 posterior a la vacunación inicial. La primera inmunización con MVA-BN tat reactivó significativamente la respuesta de anticuerpos al MVA en estos monos inmuno comprometidos que fue adicionalmente reactivada con la tercera inmunización seis semanas más tarde (Fig. 6). Estos resultados demostraron adicionalmente que la MVA-BN puede reactivar respuestas inmune en presencia de una inmunidad pre-existente significativa al MVA, incluso en monos inmuno comprometidos. Aunque la respuesta inmune de los monos fue reactivada a continuación de la inmunizaciones con MVA-BN tat los niveles del SIV permanecieron estables, indicando que las inmunizaciones con MVA-BN son seguras y no afectan los niveles del SIV en los monos inmuno comprometidos (Fig. 7).

Este estudio ha demostrado que la MVA-BN puede inducir respuestas inmune con la inoculación primaria y con la reactivación en monos rhesus inmuno comprometidos y que las inmunizaciones con la MVA-BN son seguras y no afectan los niveles de la viremia en los animales infectados con el SIV. El retraso en la progresión del SIDA como enfermedad en animales vacunados con la vacuna de MVA-BN nef, indica que una respuesta inmune fue exitosamente generada para el nef.

2.2.4.: Vacunación Terapéutica de Monos Infectados con el SIV Sometidos a Tratamiento Anti-Retroviral

Una vacuna del HIV terapéutica basada en la MVA-BN es posible usarla en individuos sometidos a terapia anti-retroviral. Por lo tanto este estudio investigó la seguridad (efecto en los niveles del SIV) y la eficacia de los MVA recombinantes que codifican una variedad de antígenos del SIV (gag, pol, env, rev, tat, y nef) en monos infectados con el SIV tratados con PMPA. El PMPA es un análogo nucleósido y es efectivo contra el HIV y el SIV (Rosenwirth, B. *y otros*, 2000, J Virol 74,1704-11).

Construcciones

Todas las construcciones del MVA recombinante fueron propagadas en células de CEF, purificadas con sucrosa y formuladas en Tris pH 7.4.

Protocolo de Vacunación

Tres grupos (n = 6) de monos rhesus (*Macaca mulatta*) fueron infectados con 50 MID_{50} de un aislado del SIV primario patogénico (1XC) y luego tratados diariamente con PMPA (60 mg/kg entregados por vía s.c.) por 19 semanas. A la semana 10, los animales fueron vacunados con MVA-BN recombinante (vía i.m.), o solución salina y recibieron vacunaciones idénticas 6 semanas más tarde. El grupo 1 recibió una mezcla de MVA gag-pol y MVA-env, el grupo 2 recibió MVA-tat, MVA-rev y MVA-nef, mientras el grupo 3 recibió la solución salina. El estado clínico de los animales fue frecuentemente monitoreado y muestras regulares de sangre fueron tomadas para la medición de la viremia, los parámetros de inmunidad, y un rango completo de parámetros de química clínica de la sangre y hematología.

Todos los animales establecieron cargas altas del SIV que tuvieron su pico 2 semanas posteriores a la infección (Fig. 8). A continuación de un tratamiento diario con PMPA los niveles del SIV decrecieron y se estabilizaron a niveles bajos a la semana 9. Como en las vacunaciones con el MVA del estudio previo en la semana 10 y 16 no hubo efecto sobre los niveles del SIV, indicando que la MVA-BN es un vector de vacuna seguro para animales inmuno comprometidos. Una vez que los animales asimilaron el tratamiento con PMPA (semana 21) los niveles del SIV se incrementaron. Aunque tres animales en el grupo 1 habían reducido los niveles del SIV comparados con el grupo control 3, no hubo una diferencia significativa en la carga promedio del SIV entre cualquiera de los grupos a continuación de la terminación del tratamiento con PMPA (Fig. 8). Usando un ELISA para los lisados de células T infectadas con el SIV los animales en todos los grupos generaron una respuesta de anticuerpos para el SIV en la semana 4 a continuación de la infección (Fig. 9). El título del anticuerpo del SIV en el grupo control (solución salina) cayó durante el tratamiento con PMPA y se incrementó rápidamente cuando el tratamiento con PMPA fue detenido, reflejando la caída y el subsiguiente incremento en los niveles del SIV durante la terapia anti-retroviral (Fig. 9). Un patrón similar en el título de anticuerpos del SIV fue observado en el grupo 2 que recibió MVA-tat, MVA-rev y MVA-nef, reflejando posiblemente la baja expresión de estas proteínas regulatorias en los lisados de células T infectadas con el SIV usados en el ELISA. Por el contrario sin embargo, los títulos de anticuerpos anti-SIV en el grupo 1 se incrementaron a continuación de las vacunaciones con MVA gag-pol y MVA-env en la semana 10, indicando que la MVA-BN recombinante puede reactivar la respuesta inmune al SIV en animales infectados (SIV) que son sometidos a terapia anti-retroviral. De manera importante, los títulos de anticuerpos anti-SIV fueron reactivados a continuación de la inmunización secundaria a la semana 16 demostrando nuevamente que el MVA puede reactivar respuestas inmune en animales inmuno comprometidos, incluso en presencia de una inmunidad pre-existente al MVA (Fig. 8). Los títulos de anticuerpos anti-MVA en el grupo 1 también reflejaron este patrón con la generación de una respuesta de anticuerpos a continuación de la inmunización primaria y esto fue significativamente reactivado a continuación de la vacunación secundaria (Fig. 10).

Referencias

Schneider, J., Gilbert, SC., Blanchard, TJ., Hanke, T., Robson, KJ., Hannan, CM., Becker, M., Sinden, R., Smith, GL., y Hill, AVS. 1998. Inmunogenicidad mejorada para la inducción de células T CD8+ y la completa eficacia de la vacunación de ADN de la malaria reactivando con el virus vaccinia Ankara modificado. Nat. Med. 4; 397-402.

Thomson, SA., Sherritt, MA., Medveczky, J., Elliott, SL., Moss, DJ., Fernando, GJP., Brown, LE., y Suhrbier, A. 1998. Entrega de epítopos de células T citotóxicas CD8 múltiples por vacunación de ADN. *J. Immunol*. 160: 1717.

Tabla 1:

	CEF	**Hela**	**HaCat**	**143B**	**BHK**	**Vero**	**CV-1**
MVA-BN	579.73	0.04	0.22	0.00	65.88	2.33	0.00
MVA-575	796.53	0.15	1.17	0.02	131.22	10.66	0.06
MVA-HLR	86.68	124.97	59.09	0.83	87.86	34.97	29.70
MVA-Vero	251.89	27.41	1.28	2.91	702.77	1416.46	4.48

Amplificación del virus por encima del nivel de entrada después de 4 días de infección

Proporción de amplificación = salida $TCID_{50}$ – entrada $TCID_{50}$.

Los valores están en $TCID_{50}$.

Número de referencia del archivo del agente o del solicitante BN 35 PCT	Solicitud internacional No.

INDICACIONES RELACIONADAS CON EL MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Regla 13 bis)

A. La indicaciones hechas a continuación se relacionan con el microorganismo referido en la descripción en la página 6 , línea 7 .	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPOSITO Depósitos adicionales son identificados en una página adicional □	
Nombre de la institución de depósito ECACC Colección Europea de Cultivos de Células	
Dirección de la institución de depósito (incluyendo código postal y país) Centre for Applied Microbiology & Research Salisbury Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido	
Fecha del depósito Agosto 30, 2000	Número de Acceso 00083008
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no es aplicable) Esta información continua en una hoja adicional □	
Con respecto a todos los Estados designados para los cuales tal acción es posible y hasta la extensión que sea legalmente permisible bajo la ley del Estado designado, es requerido que una muestra del microorganismo depositado este disponible solamente por la emisión del mismo a un experto independiente, de acuerdo con la legislación de patente relevante, por ejemplo, CPE Regla 28 (4); Reglas de Patente GB 1995, Lista 2, Párrafo 3; Regulación de Australia 3.25 (3); Acta de Patentes de Dinamarca Secciones 22 y 33(3) y cláusulas generalmente similares mutatis mutandis para cualquier otro Estado designado.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES ESTAN HECHAS LAS INDICACIONES (si las indicaciones no son para todos los Estados designados)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no es aceptable)	
Las indicaciones listadas a continuación serán sometidas al Buró Internacional posteriormente (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, “Número de Acceso del Depósito”)	

Para uso solamente de la Oficina receptora	Para uso solamente del Buró Internacional
X Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional	X Esta hoja fue recibida por el Buró Internacional el: 08.03.02
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

Número de referencia del archivo del agente o del solicitante BN 35 PCT	Solicitud internacional No.

INDICACIONES RELACIONADAS CON EL MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Regla 13 bis)

A. La indicaciones hechas a continuación se relacionan con el microorganismo referido en la descripción

en la página 14 , línea 1 .
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPOSITO Depósitos adicionales son identificados en una página adicional □
Nombre de la institución de depósito ECACC Colección Europea de Cultivos de Células
Dirección de la institución de depósito (incluyendo código postal y país) Centre for Applied Microbiology & Research Salisbury Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido
Fecha del depósito Diciembre 7, 2000 / Número de Acceso 00120707
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no es aplicable) Esta información continua en una hoja adicional □
Con respecto a todos los Estados designados para los cuales tal acción es posible y hasta la extensión que sea legalmente permisible bajo la ley del Estado designado, es requerido que una muestra del microorganismo depositado este disponible solamente por la emisión del mismo a un experto independiente, de acuerdo con la legislación de patente relevante, por ejemplo, CPE Regla 28 (4); Reglas de Patente GB 1995, Lista 2, Párrafo 3; Regulación de Australia 3.25 (3); Acta de Patentes de Dinamarca Secciones 22 y 33(3) y cláusulas generalmente similares mutatis mutandis para cualquier otro Estado designado.
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES ESTAN HECHAS LAS INDICACIONES (si las indicaciones no son para todos los Estados designados)
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no es aceptable)
Las indicaciones listadas a continuación serán sometidas al Buró Internacional posteriormente (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, “Número de Acceso del Depósito”)

Para uso solamente de la Oficina receptora	Para uso solamente del Buró Internacional
X Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional	X Esta hoja fue recibida por el Buró Internacional el: 08.03.02
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

Número de referencia del archivo del agente o del solicitante BN 35 PCT	Solicitud internacional No.

INDICACIONES RELACIONADAS CON EL MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Regla 13 bis)

A. La indicaciones hechas a continuación se relacionan con el microorganismo referido en la descripción en la página 30 , línea 29 .
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPOSITO Depósitos adicionales son identificados en una página adicional □
Nombre de la institución de depósito PHLS Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology & Research ECACC Colección Europea de Cultivos de Células, CAMR
Dirección de la institución de depósito (incluyendo código postal y país) ECACC Colección Europea de Cultivos de Células, CAMR

Porton Down, Salisbury, SP4, OJG, Reino Unido	
Fecha del depósito Enero 27, 1994	Número de Acceso V94012707
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no es aplicable) Esta información continua en una hoja adicional ☐	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES ESTAN HECHAS LAS INDICACIONES (si las indicaciones no son para todos los Estados designados)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no es aceptable)	
Las indicaciones listadas a continuación serán sometidas al Buró Internacional posteriormente (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, “Número de Acceso del Depósito”)	

Para uso solamente de la Oficina receptora	Para uso solamente del Buró Internacional
X Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional	X Esta hoja fue recibida por el Buró Internacional el: 08.03.02
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

REIVINDICACIONES

1. Cepa del virus vaccinia Ankara modificado MVA-BN depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células (ECACC), Salisbury (GB) bajo el número V00083008 y derivados de la misma, donde dicha cepa de Ankara MVA-BN o sus derivados están caracterizados (i) en ser capaces de replicación reproductiva en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y en la línea celular de riñón de hámster bebé BHK pero no capaces de replicación reproductiva en las líneas celulares humanas siguientes: la línea celular de osteosarcoma del hueso humano 143B, la línea celular del queratinocito humano HaCat y la línea celular del adenocarcinoma cervical humano HeLa y (ii) por una falla para replicarse in vivo en ratones severamente inmuno comprometidos que son incapaces de producir células B y T maduras.

2. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a la reivindicación 1, que es purificada del clon.

3. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a la reivindicación 1 o 2 que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

4. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a la reivindicación 3, donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga es seleccionada de una secuencia que codifica para al menos un antígeno, un epítopo antigénico, y/o un compuesto terapéutico.

5. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a la reivindicación 4, donde los epítopos antigénicos son de los virus seleccionados de la familia del virus de la influenza, el Flavivirus, el Paramixovirus, el virus de la Hepatitis, el virus de la inmuno deficiencia Humana o de los virus que causan fiebre hemorrágica.

6. MVA-BN de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga es el gen nef.

7. Composición farmacéutica que comprende MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador, diluente y/o aditivo farmacéuticamente aceptable.

8. Vacuna que comprende MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7 o vacuna de acuerdo a la reivindicación 8 que comprende al menos 10^2 $TCID_{50}$ MVA-BN o un derivado de la misma.

10. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, la composición de acuerdo a la reivindicación 7 o 9 o la vacuna de acuerdo a la reivindicación 8 o 9 para afectar, preferiblemente inducir, una respuesta inmunológica en un animal vivo, incluyendo un humano.

11. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, la composición de acuerdo a la reivindicación 7 o 9 o la vacuna de acuerdo a la reivindicación 8 o 9 para la vacunación de un animal vivo, incluyendo un humano, contra una enfermedad del poxvirus humano.

12. MVA-BN o un derivado de la misma, composición o vacuna de acuerdo a la reivindicación 11, donde la enfermedad del poxvirus humano es la viruela.

13. MVA-BN o un derivado de la misma, composición o vacuna de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el animal, incluyendo el humano, está inmuno comprometido.

14. MVA-BN o un derivado de la misma, composición o vacuna de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el animal, incluyendo el humano, tiene una inmunidad pre-existente a los poxvirus.

15. MVA-BN o un derivado de la misma, composición o vacuna de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el animal, incluyendo el humano, está sometido a terapia antiviral.

16. MVA-BN o un derivado de la misma, composición o vacuna de acuerdo a la reivindicación 15, donde la terapia anti-viral es una terapia anti-retroviral.

17. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para introducir una secuencia de ácido nucleico homóloga y/o heteróloga en las células diana.

18. Uso de la MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento o una vacuna para inducir una respuesta inmunológica en un cuerpo animal vivo incluyendo un humano.

19 Uso de acuerdo a la reivindicación 18, donde el medicamento o la vacuna es contra la enfermedad del poxvirus humano.

20. Uso de acuerdo a la reivindicación 19, donde la enfermedad del poxvirus humano es la viruela.

21. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde el medicamento o la vacuna comprende al menos 10^2 $TCID_{50}$ de MVA-BN o un derivado de la misma.

22. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde la MVA-BN o un derivado de la misma es para ser administrado en cantidades terapéuticamente efectivas en una primera inoculación ("inoculación primaria") y una segunda inoculación ("inoculación de reactivación").

23. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde el animal está inmuno comprometido.

24. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, donde el animal tiene una inmunidad pre-existente a los poxvirus.

25. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, donde el animal está sometido a terapia antiviral.

26. Uso de acuerdo a la reivindicación 25, donde la terapia antiviral es una terapia anti-retroviral.

27. MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como adyuvante.

28. Método para introducir una secuencia de ácido núcleico homóloga y/o heteróloga en las células diana in vitro que comprende la infección de las células diana con MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

29. Método para producir un péptido o proteína que comprende:

a) infección de una célula hospedera con MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;

b) cultivo de la célula infectada bajo condiciones apropiadas; y

c) aislamiento y/o enriquecimiento del péptido y/o la proteína producida por dicha célula hospedera.

30. Método para producir MVA-BN o un derivado de la misma que comprende:

a) infección de una célula hospedera con MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;

b) cultivo de la célula infectada bajo condiciones apropiadas; y

c) aislamiento y/o enriquecimiento de la MVA-BN o un derivado de la misma producida por dicha célula hospedera.

31. Célula, preferiblemente una célula humana, que contiene MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

32. Kit para inmunización con inoculación primaria/reactivación que comprende MVA-BN o un derivado de la misma de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una composición de acuerdo a la reivindicación 8 o 10, una vacuna de acuerdo a la reivindicación 8 o 9 para una primera inoculación ("inoculación primaria") en un primer frasco/contenedor y para una segunda inoculación ("inoculación de reactivación") en un segundo frasco/contenedor.

Fig. 1A

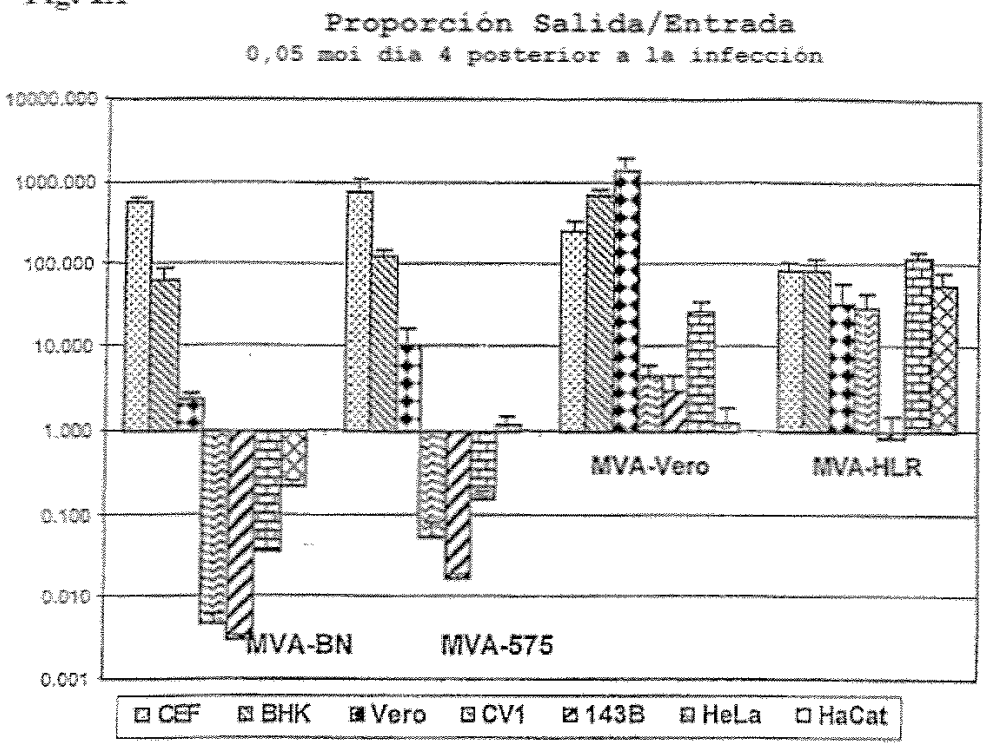

Proporción Salida/Entrada
0,05 moi dia 4 posterior a la infección
10000.000
1000.000
100.000
10.000
1.000
0.100
0.010
0.001
MVA-BN
MVA-575
MVA-Vero
MVA-HLR
CEF
BHK
Vero
CV1
143B
HeLa
HaCat

Fig. 1B

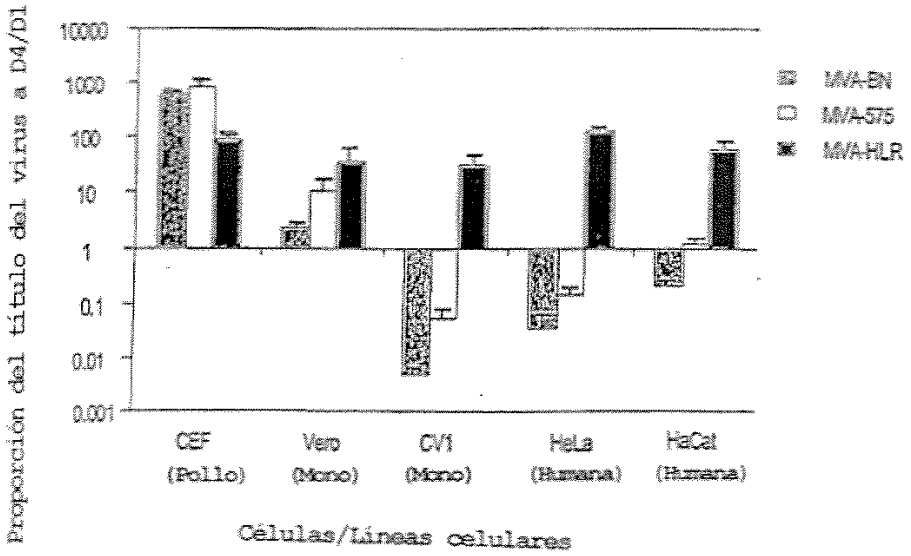

Proporción del título del virus a D4/D1
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
MVA-BN
MVA-575
MVA-HLR
CEF (Pollo)
Vero (Mono)
CV1 (Mono)
HeLa (Humana)
HaCat (Humana)
Células/Líneas celulares

Fig. 2

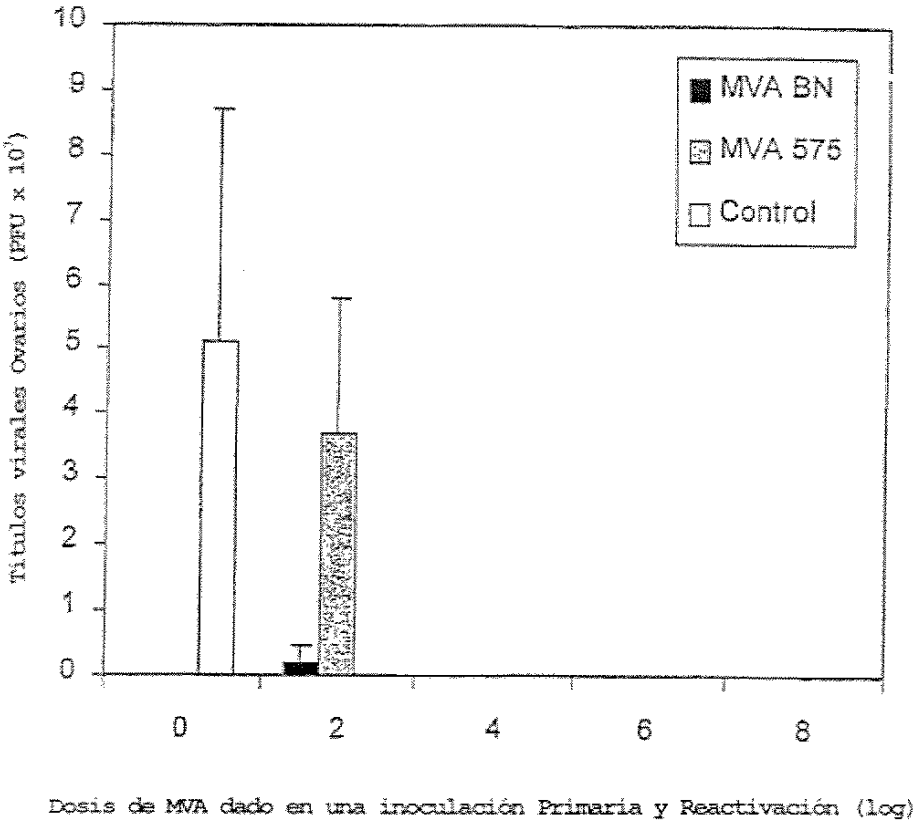
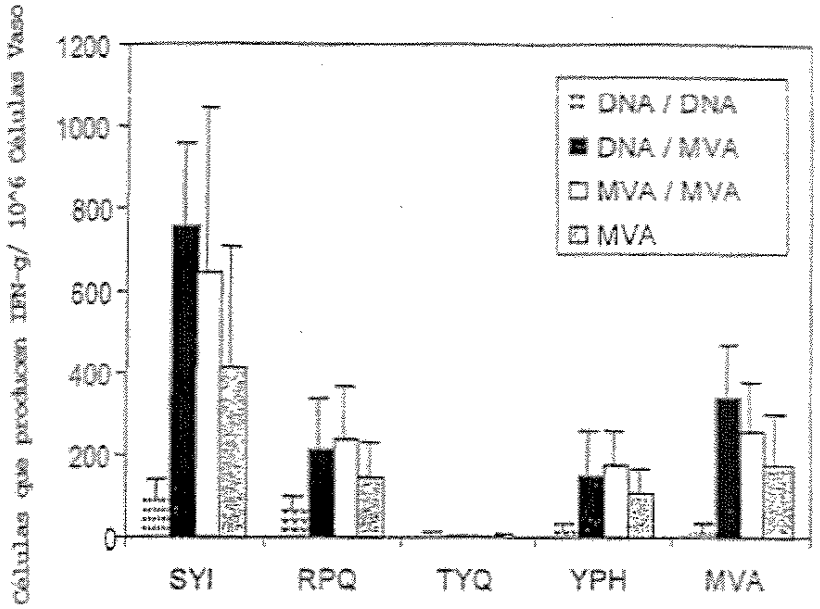

10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Títulos virales Ovarios (PFU x 10⁴)
MVA BN
MVA 575
Control
0
2
4
6
8
Dosis de MVA dado en una inoculación Primaria y Reactivación (log)

Fig. 3

A


Células que producen IFN-g/ 10^6 Células Vaso
1200
1000
800
600
400
200
0
DNA / DNA
DNA / MVA
MVA / MVA
MVA
SYI
RPQ
TYQ
YPH
MVA

B

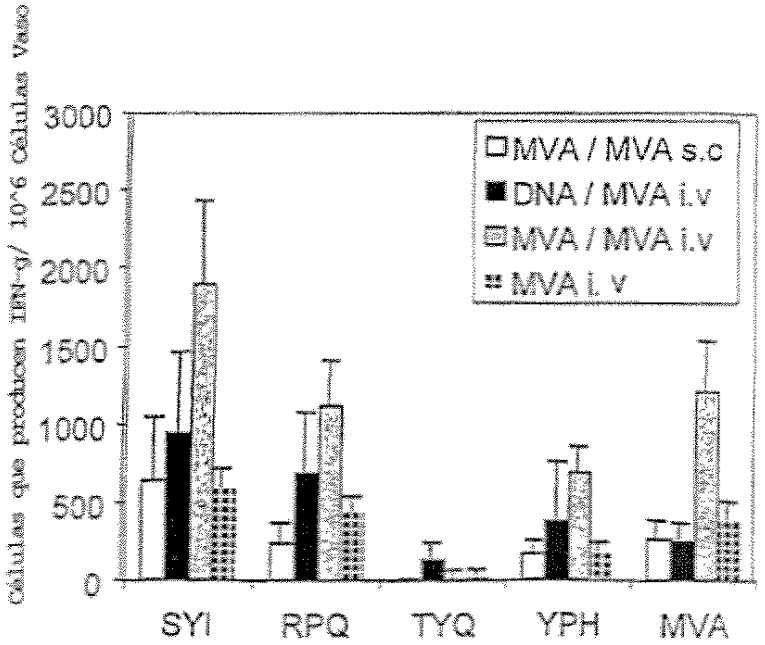

Células que producen IFN-g/ 10^6 Células Vaso
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
MVA / MVA s.c
DNA / MVA i.v
MVA / MVA i.v
MVA i. v
SYI
RPQ
TYQ
YPH
MVA

Fig. 3C

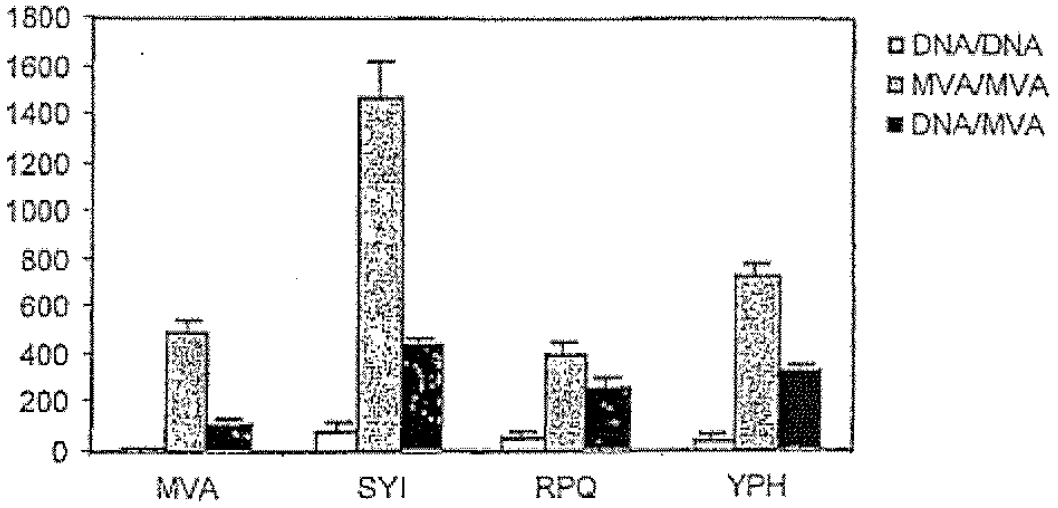

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MVA
SYI
RPQ
YPH
DNA/DNA
MVA/MVA
DNA/MVA

Fig. 4

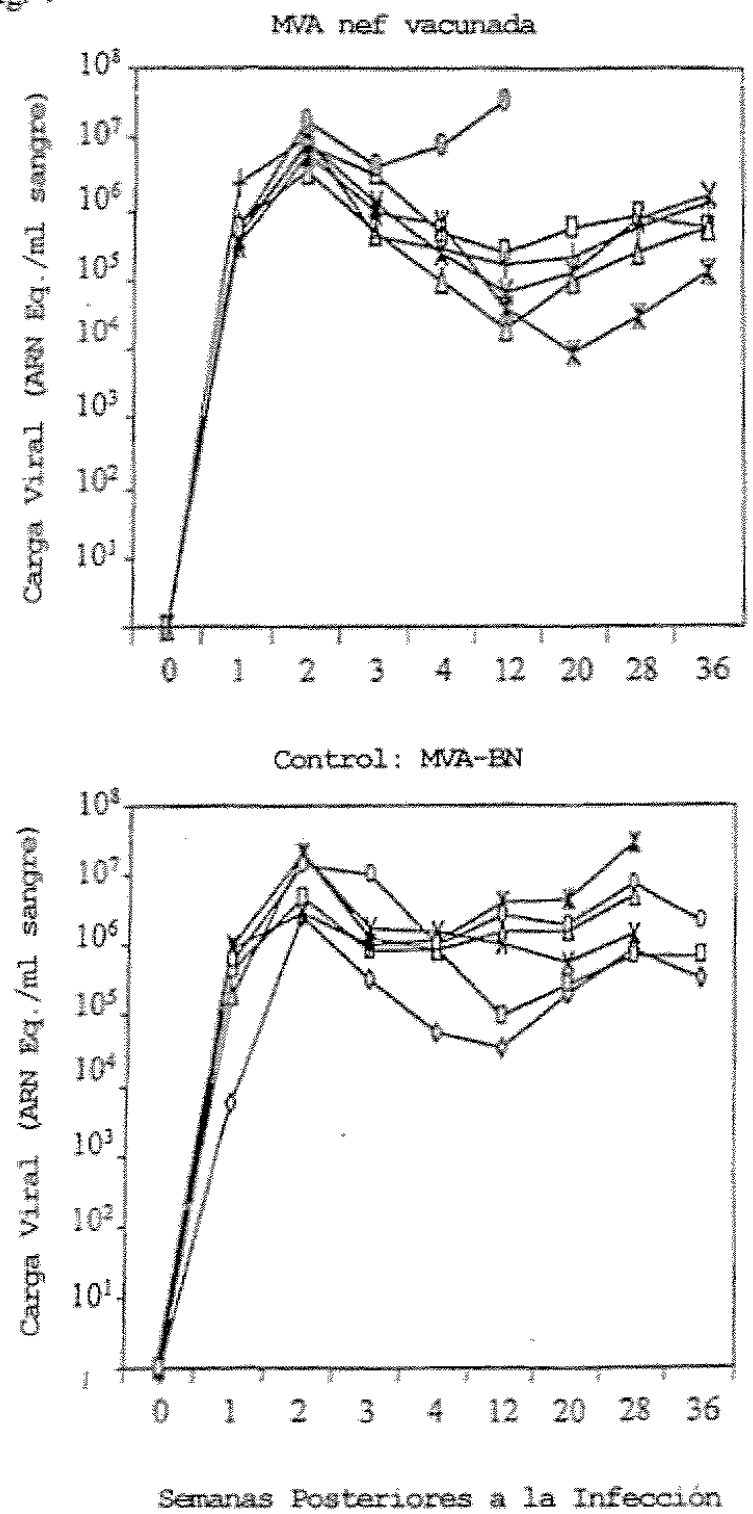

MVA nef vacunada
Carga Viral (ARN Eq./ml sangre)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0 1 2 3 4 12 20 28 36
Control: MVA-BN
Carga Viral (ARN Eq./ml sangre)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
1
0 1 2 3 4 12 20 28 36
Semanas Posteriores a la Infección

Fig. 5

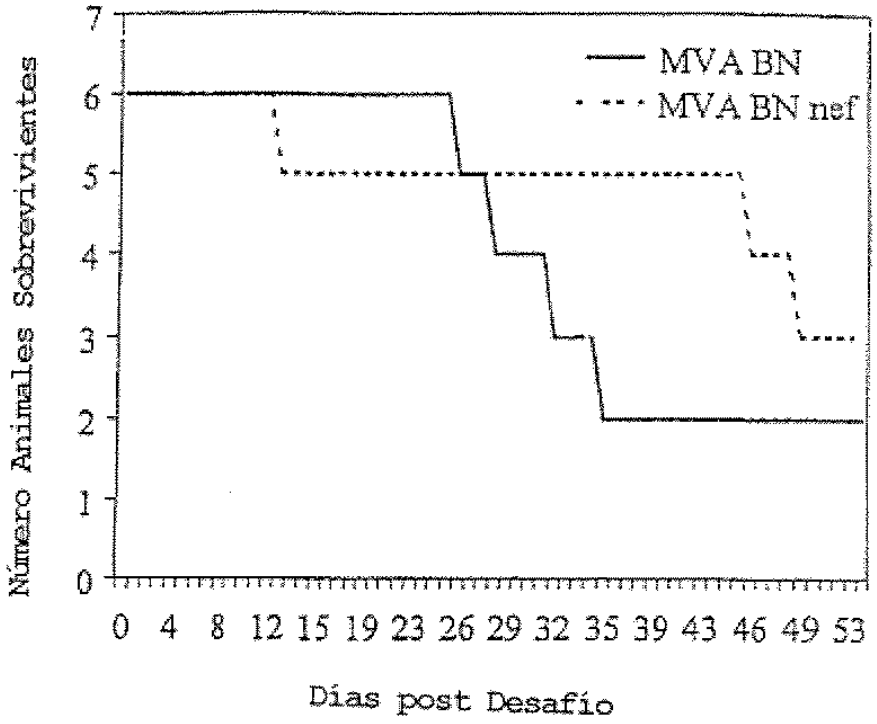

MVA BN
MVA BN nef
Número Animales Sobrevivientes
0
1
2
3
4
5
6
7
0 4 8 12 15 19 23 26 29 32 35 39 43 46 49 53
Dias post Desafío

Fig. 6

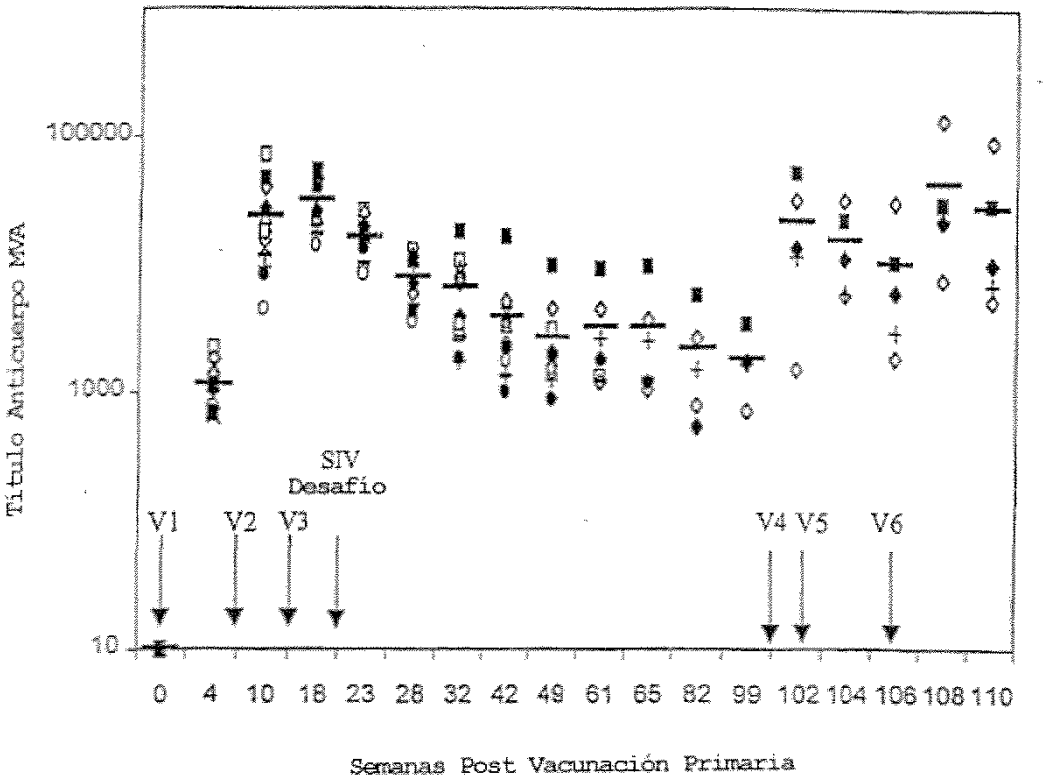

100000
1000
10
Título Anticuerpo MVA
SIV
Desafío
V1
V2
V3
V4
V5
V6
0
4
10
18
23
28
32
42
49
61
65
82
99
102
104
106
108
110
Semanas Post Vacunación Primaria

Fig. 7

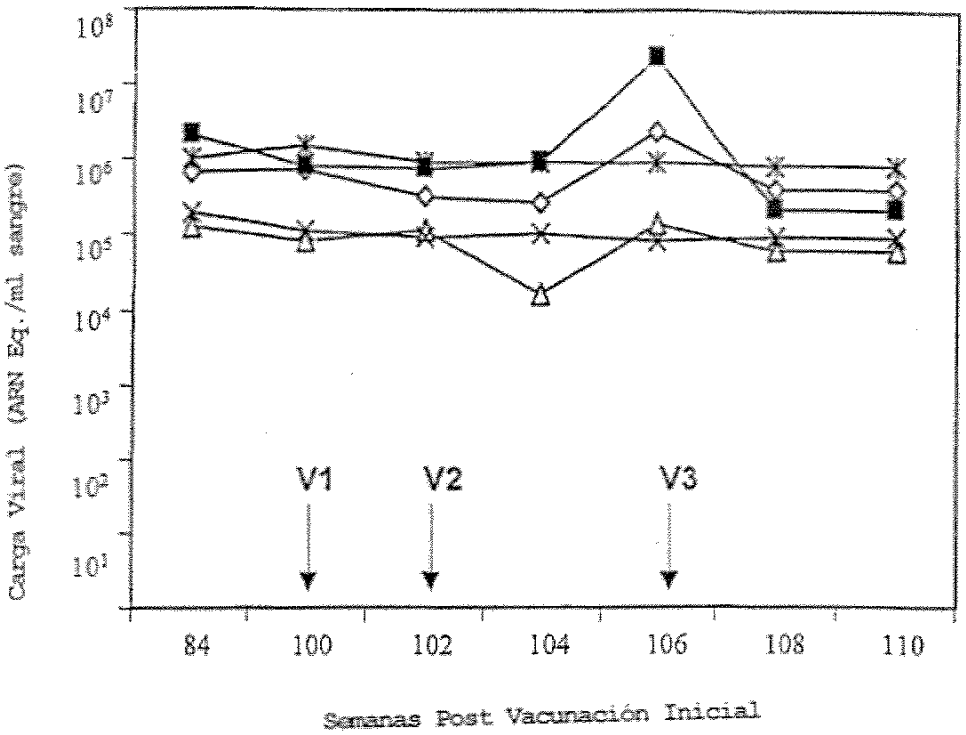

10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
Carga Viral (ARN Eq./ml sangre)
V1
V2
V3
84
100
102
104
106
108
110
Semanas Post Vacunación Inicial

Fig. 8

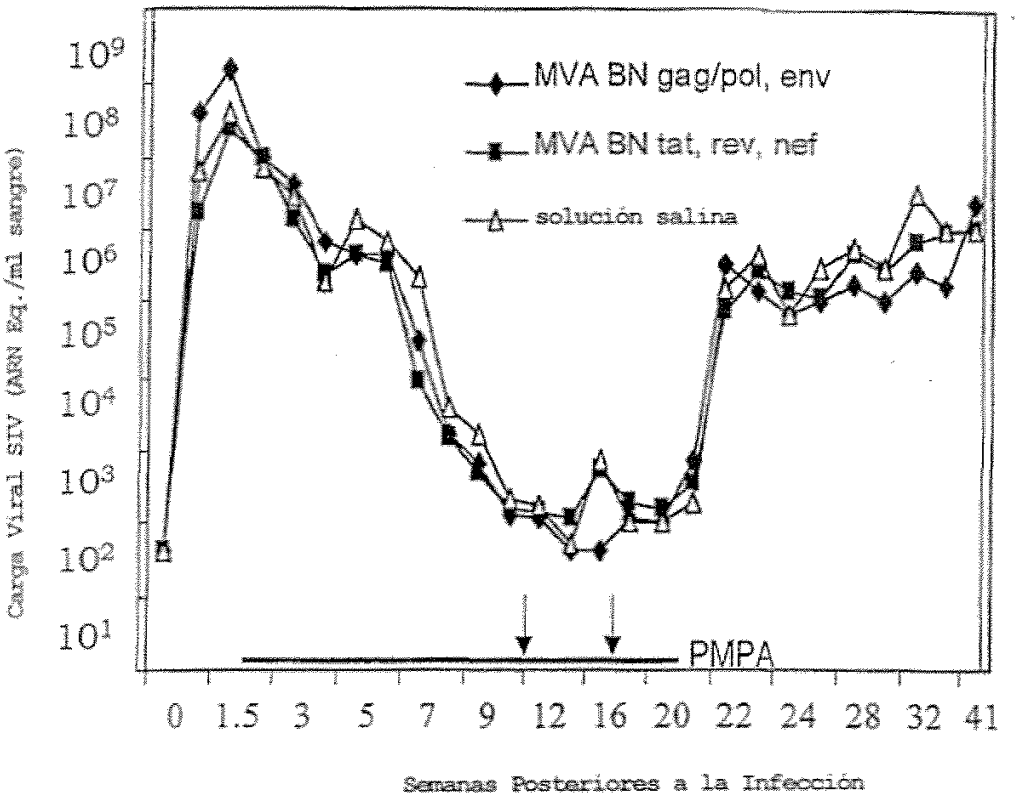

MVA BN gag/pol, env
MVA BN tat, rev, nef
solución salina
PMPA
Carga Viral SIV (ARN Eq./ml sangre)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0 1.5 3 5 7 9 12 16 20 22 24 28 32 41
Semanas Posteriores a la Infección

Fig. 9

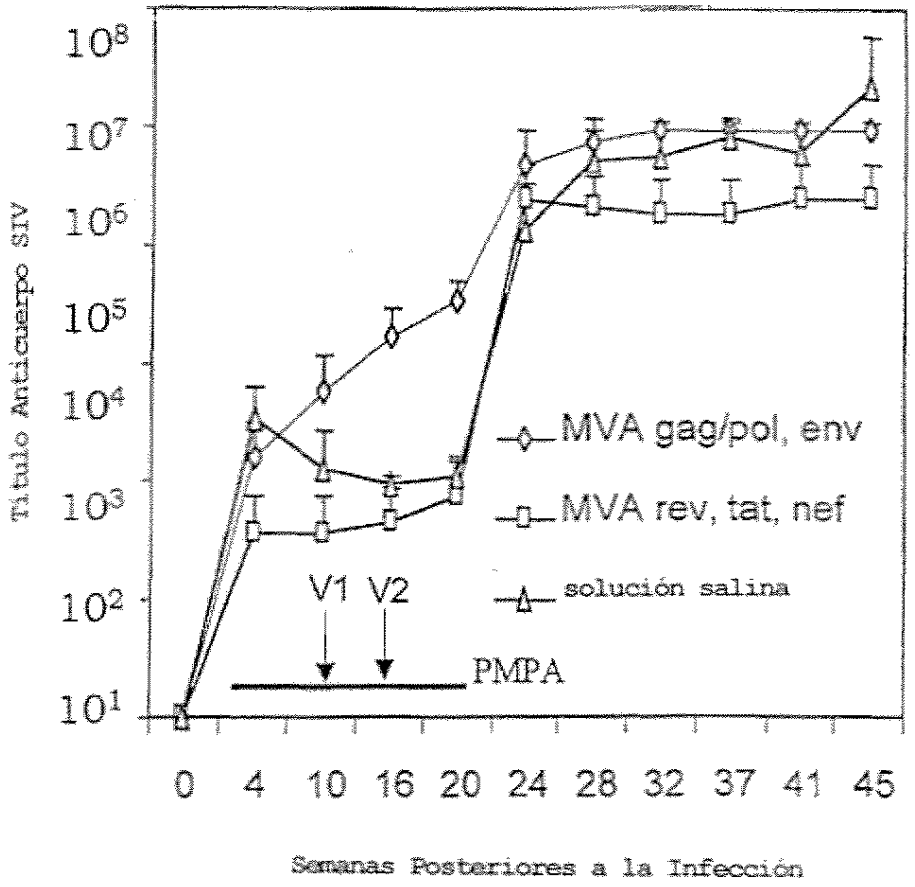

Título Anticuerpo SIV
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
MVA gag/pol, env
MVA rev, tat, nef
solución salina
V1 V2
PMPA
0 4 10 16 20 24 28 32 37 41 45
Semanas Posteriores a la Infección

Fig. 10

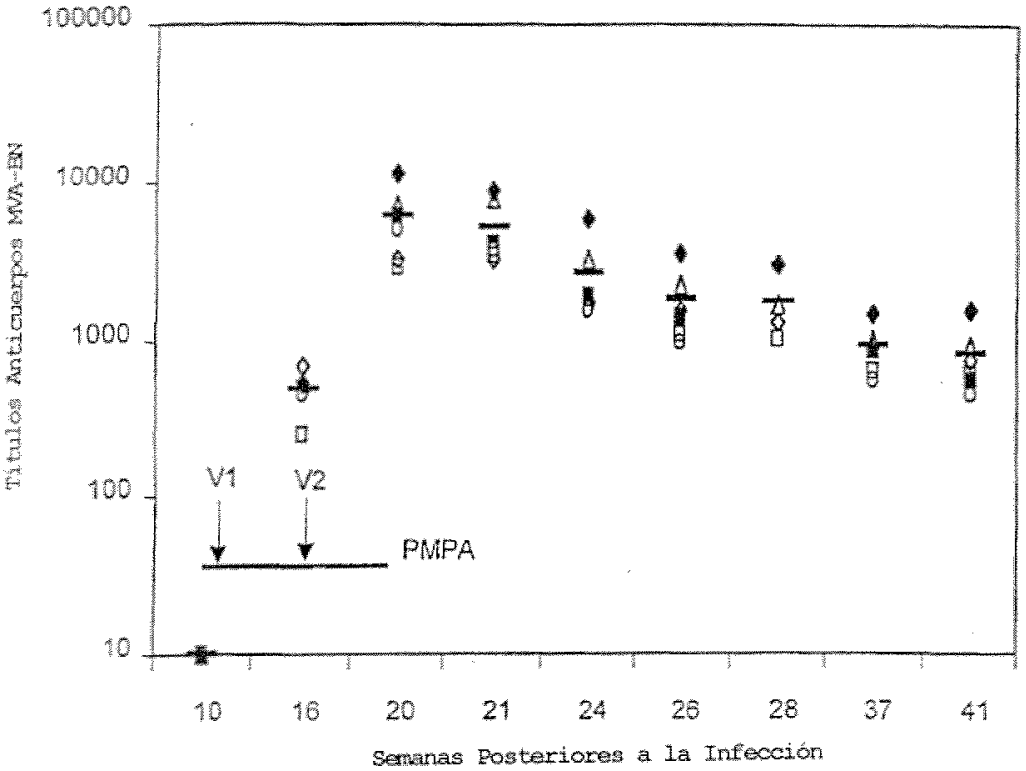
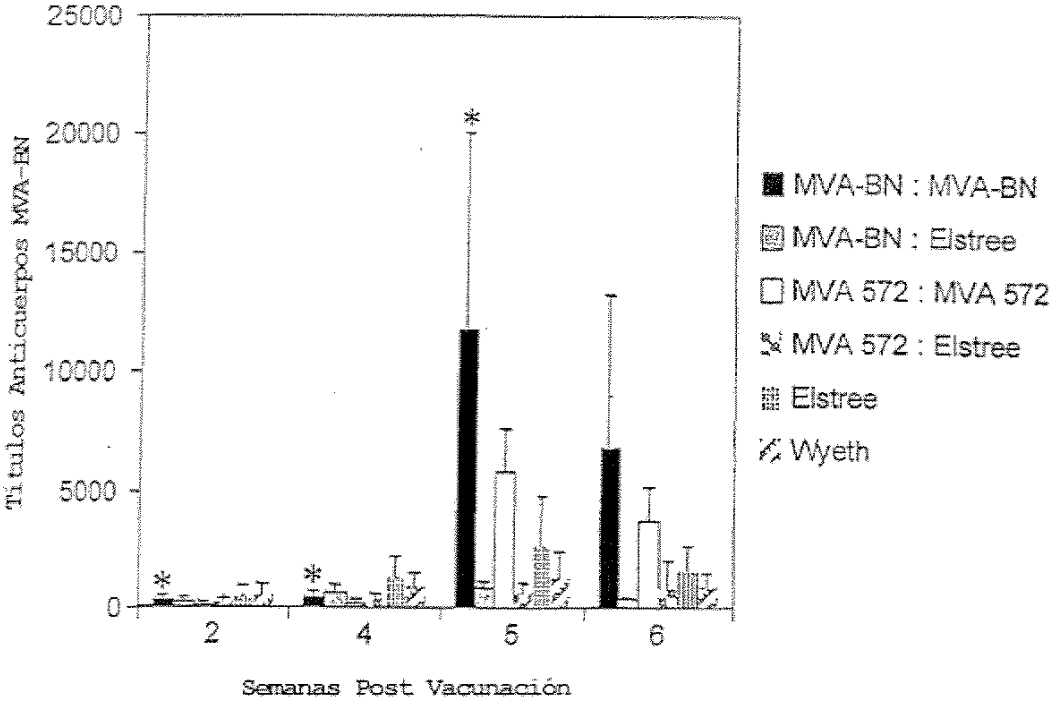

100000
10000
1000
100
10
Títulos Anticuerpos MVA-BN
V1
V2
PMPA
10
16
20
21
24
26
28
37
41
Semanas Posteriores a la Infección

Fig. 11


25000
20000
15000
10000
5000
0
Titulos Anticuerpos MVA-BN
2
4
5
6
Semanas Post Vacunación
MVA-BN : MVA-BN
MVA-BN : Elstree
MVA 572 : MVA 572
MVA 572 : Elstree
Elstree
Wyeth